Estudo da produção de extrato enzimático celulolítico de fungos do gênero fusarium e mucor

Leidilene Cristina de Andrade
Renata Carolina Zanetti Lofrano
Boutros Sarrouh

Ano 2022

Estudo da produção de extrato enzimático celulolítico de fungos do gênero fusarium e mucor

Leidilene Cristina de Andrade

Renata Carolina Zanetti Lofrano

Boutros Sarrouh

Ano 2022

Estudo da produção de extrato enzimático celulolítico de fungos do gênero fusarium e mucor

Diagramação: Daphynny Pamplona
Correção: Maiara Ferreira
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Autores: Leidilene Cristina de Andrade
Renata Carolina Zanetti Lofrano
Boutros Sarrouh

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A553 Andrade, Leidilene Cristina de
Estudo da produção de extrato enzimático celulolítico de fungos do gênero fusarium e mucor / Leidilene Cristina de Andrade, Renata Carolina Zanetti Lofrano, Boutros Sarrouh. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-0320-3
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.203220807

1. Fungos. 2. Fusarium sp. 3. Mucor sp. 4. Endoglucanases. 5. β- glicosidases. 6. Atividade celulolítica. I. Andrade, Leidilene Cristina de. II. Lofrano, Renata Carolina Zanetti. III. Sarrouh, Boutros. IV. Título.

CDD 579.5

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao conteúdo publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que o texto publicado está completamente isento de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access, desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce,* ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

APRESENTAÇÃO

Uma das aplicações mais importantes das enzimas pertencentes ao complexo celulolítico é a hidrólise de biomassa vegetal. A reutilização da biomassa lignocelulósica significa agregar valor à cadeia produtiva, reduzindo dessa forma o seu acúmulo no meio ambiente. Nesse sentido surge a necessidade do uso de enzimas celulolíticas visando à hidrólise dessa biomassa renovável e consequentemente a liberação de açúcares redutores que poderão ser utilizados, em processos biotecnológicos como blocos de construção para a obtenção de diversos bioprodutos, que abrange desde biocombustíveis até ácidos orgânicos e biopolímeros. No presente trabalho de pesquisa foi avaliada a capacidade de produção das enzimas endoglucanases e β-glicosidases, pelos fungos *Fusarium sp.* e *Mucor circinelloides*, isolados a partir da casca de café, bem como a caracterização da atividade enzimática frente a diferentes valores de pH e temperatura, visando obter as condições ideais para a aplicação das mesmas.

SUMÁRIO

RESUMO

A produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica é uma alternativa interessante para a substituição dos combustíveis fósseis. Entretanto, o uso desta tecnologia ainda não é viável, devido ao elevado custo de produção das enzimas celulases, utilizadas para hidrolisar a celulose presente nesta biomassa a açúcares fermentescíveis. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de produção de celulases (endoglucanases e β-glicosidases), pelos fungos *Fusarium* sp. e *Mucor circinelloides strain,* isolados da casca de café, bem como caracterizar as atividades dessas enzimas frente a diferentes valores de pH e temperatura, visando obter as condições ideais para a aplicação das mesmas. E por fim, avaliar a atuação do extrato enzimático bruto dos dois fungos em conjunto, na hidrólise da casca de café pré-tratada. Inicialmente, para avaliar a produção de celulases, foi feito o teste de halo de hidrólise em meio sólido contendo carboximetilcelulose (CMC) como fonte de carbono. Em seguida, os fungos foram inoculados em meio líquido contendo (CMC) e incubados a 28°C e 180 rpm. A cada 24 horas, as amostras foram coletadas, para a obtenção do extrato enzimático bruto. Assim, a avaliação da atividade endoglicolítica foi realizada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) com CMC 2%. Já a avaliação da atividade β-glicosídica foi realizada por meio do substrato p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (pNPβG) a 0,001 M. Para a caracterização das enzimas, foram testados outros parâmetros de pH e temperatura, os quais variaram de 4 a 8 e de 30°C a 70°C, respectivamente. Pode-se concluir que, na avaliação da atividade da enzima endoglucanase, o fungo *Fusarium* sp. após 12 dias de fermentação, obteve atividade máxima de 0,2015 ± 0,0008 U/mL, sendo sua temperatura ideal de 60°C e pH 7,0. Já o fungo *M. circinelloides strain* após 12 dias de fermentação, obteve atividade máxima de 0,3016 ± 0,0018 U/mL, sendo sua temperatura ideal de 60°C e pH 8,0. Na avaliação da atividade da enzima β-glicosidase, o fungo *Fusarium* sp. após 12 dias de fermentação, obteve atividade máxima de 18,982 ± 0,087 U/mL, sendo sua temperatura ideal de 60°C e pH 6,0. Já o fungo *M.circinelloides strain* após 12 dias de fermentação, obteve atividade máxima de 16,338 ± 0,104 U/mL, sendo sua temperatura ideal de 50°C e pH 5,0. E por fim, avaliou-se a aplicação das enzimas na hidrólise da casca de café pré-tratada, a qual obteve um valor máximo de hidrolise de 0,3945 g/L de açúcares redutores, após 96 horas de hidrólise. Por meio dos resultados obtidos percebe-se que os fungos analisados apresentaram um potencial promissor para a produção dessas duas enzimas em estudo, destacando a produção da β-glicosidase pelos mesmos.

PALAVRAS-CHAVES: *Fusarium* sp.; *Mucor sp*; Endoglucanases; β- glicosidases; Atividade celulolítica.

ABSTRACT

The production of ethanol from the lignocellulosic biomass is an interesting alternative for the substitution of fossil fuels. However, the use of this technology is still not feasible, due to the high cost of production of the enzymes cellulases, used to hydrolyze the cellulose present in this biomass to fermentable sugars. Thus, the objective of this work was to evaluate the production capacity of cellulases (endoglucanases and β- glycosidases) by Fusarium sp. and Mucor circinelloides strain, isolated from the coffee husk, as well as characterize the activities of these enzymes against different pH and temperature values, aiming to obtain the ideal conditions for the application of the same. Finally, to evaluate the performance of the crude enzyme extract of the two fungi together, in the hydrolysis of the pretreated coffee husk. Initially, to evaluate the production of cellulases, the solid-state hydrolysis halo test containing carboxymethylcellulose (CMC) was performed as the carbon source. The fungi were then inoculated into liquid medium containing (CMC) and incubated at 28 ° C and 180 rpm. Every 24 hours, the samples were collected to obtain the crude enzyme extract. Thus, the endoglycolytic activity evaluation was performed using the dinitrosalicylic acid (DNS) method with 2% CMC. The β-glycosidic activity was evaluated by means of the p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside substrate (pNPβG) at 0.001 M. For the characterization of the enzymes, other parameters of pH and temperature were tested, which varied from 4 at 8 and from 30 ° C to 70 ° C, respectively. It can be concluded that, in the evaluation of the activity of the enzyme endoglucanase, the fungus Fusarium sp. after 12 days of fermentation, obtained maximum activity of 0.2015 ± 0.0008 U / mL, its ideal temperature being 60 ° C and pH 7.0. The fungus M. circinelloides strain after 12 days of fermentation obtained a maximum activity of 0.3016 ± 0.0018 U / mL, being its ideal temperature of 60 ° C and pH 8.0. In the evaluation of the activity of the enzyme β-glycosidase, the fungus Fusarium sp. after 12 days of fermentation, obtained maximum activity of 18,982 ± 0,087 U / mL, being its ideal temperature of 60 ° C and pH 6.0. The fungus M. circinelloides strain after 12 days of fermentation, obtained maximum activity of 16,338 ± 0,104 U / mL, being its ideal temperature of 50 ° C and pH 5.0. Finally, the application of the enzymes in the hydrolysis of the pretreated coffee husk was evaluated, which obtained a maximum hydrolysis value of 0.3945 g / L of reducing sugars, after 96 hours of hydrolysis. By means of the obtained results we can see that the analyzed fungi presented a promising potential for the production of these two enzymes under study, highlighting the β-glucosidase production.

KEYWORDS: *Fusarium* sp.; *Mucor sp.*; Endoglucanases; β- glycosidases; Cellulytic activity.

INTRODUÇÃO

A consciência ambiental juntamente com a escassez de recursos naturais, demonstra que o grande desafio da humanidade para as próximas décadas é obter um desenvolvimento sustentável. Nesse sentido, a produção de etanol de segunda geração, a partir da utilização de resíduos lignocelulósicos, tem se mostrado uma tecnologia promissora, uma vez que, representa uma fonte alternativa aos combustíveis fósseis. Desse modo, além de reduzir os impactos ambientais provocados pelo acúmulo desta biomassa na natureza (LIN; TANAKA, 2006), reduz a emissão de gases do efeito estufa para a atmosfera (LIU et al., 2012; SOCCOL et al., 2011).

Para se produzir etanol a partir da biomassa lignocelulósica, esta matéria prima deve passar por uma etapa de pré-tratamento para a remoção da lignina e hemicelulose, em seguida pela etapa de hidrólise enzimática ou química para a liberação de açúcares fermentescíveis e por fim, pela etapa de fermentação com a subsequente destilação (LIU et al., 2012; SINGH et al., 2013; SU et al., 2012; ZHENG et al., 2009).

No entanto, a hidrólise enzimática mostra-se mais vantajosa que a hidrólise ácida, por acontecer em condições mais brandas com baixa gasto de energia. Já a hidrólise ácida demanda investimentos em equipamentos caros, resistentes à corrosão e pode gerar subprodutos que degradam os polissacarídeos, o que leva a diminuição da eficiência do processo de fermentação (RABELO, 2010).

As enzimas utilizadas para o processo de hidrólise da celulose são as celulases. Contudo, sua utilização na indústria ainda é limitada pelo seu elevado custo de produção. Por essa razão, inúmeros estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver novos bioprocessos, menos onerosos na produção de enzimas celulolíticas, assim como bioprospectar novos microrganismos com maior potencial celulolítico (BAEK et al., 2012; BANSAL et al., 2012; CUNHA et al., 2012; PARK; NARUSE; KATO, 2011; SINGHANIA, 2011; SINGHVI et al., 2011), sendo esta uma estratégia viável para a obtenção de enzimas a um baixo custo.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de produção das enzimas celulases (endoglucanases e β-glicosidases), produzidas pelos fungos *Fusarium* sp. e *Mucor circinelloides strain* isolados da casca de café, bem como caracterizar as atividades dessas enzimas frente a diferentes valores de pH e temperatura. E por fim, avaliar a atuação do extrato enzimático bruto dos dois fungos em conjunto na hidrólise da casca de café pré-tratada.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 I BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica é considerada o recurso renovável mais abundante do mundo (CHU et al., 2012; LIU et al., 2012), abrangendo a metade do peso seco dos vegetais (SANCHEZ, 2009; ADSUL et al., 2005), sendo o principal componente estrutural das plantas. Esta biomassa é um material complexo que é composto por três grandes frações orgânicas: a celulose, que é um homopolímero cristalino de glicose que compõe de 40-50% dessa biomassa; a hemicelulose, que é um polímero heterogêneo, composta por diferentes pentoses e hexoses, compreendendo entre 25-35% da biomassa lignocelulósica e a lignina que representa entre 25-35% dessa biomassa. Estes três componentes são unidos entre si por ligações covalentes, e formam uma espécie de rede complexa, que confere resistência e proteção contra os ataques de microrganismo (VARNAI et al., 2010; DOUGHERTY et al., 2012), como pode ser observado na Figura 1.
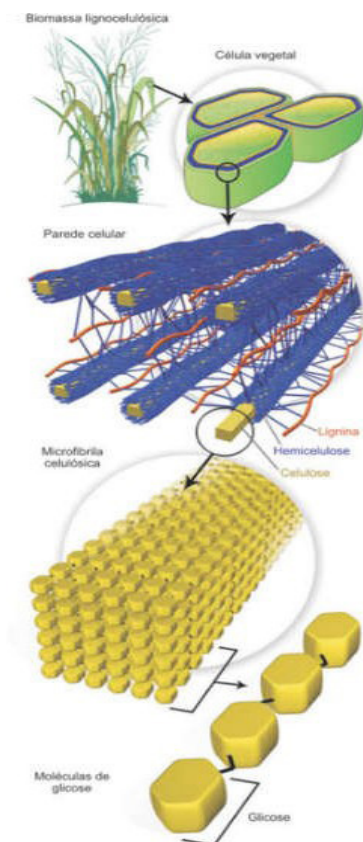
Figura 1 - Estrutura da biomassa lignocelulósica (Santos et al., 2012).

1.1 Celulose

Na célula vegetal, a celulose atua conferindo proteção osmótica e resistência estrutural, sendo o principal polissacarídeo da parede celular das plantas (BAYER; LAMED, 1992). A celulose consiste de um polímero linear não ramificado, de 8.000 a 12.000 unidade de glicose, unidas por ligações β-1,4 glicosídicas, e sua menor unidade repetitiva é a celobiose, (TURNER et al., 2007). Este polímero apresenta uma extremidade redutora e uma extremidade não redutora. As características descritas acima podem ser observadas na Figura 2.
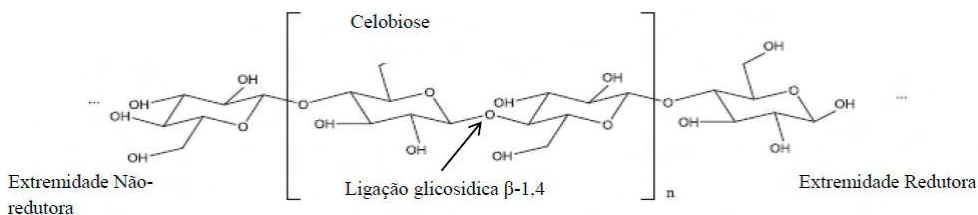
Figura 2: Estrutura da molécula de celulose, ilustrando a Celobiose formada pela união de duas moléculas de glicose, e suas extremidade redutora e não redutora (adaptado de ZHANG; LYND, 2004).

As cadeias longas de celulose formam as microfibrilas, organizadas em lamelas, formando a estrutura fibrosa da parede celular. As microfibrilas são mantidas unidas por ligações de hidrogênio, que mantém a rede mais fixa e com características hidrofóbicas (DASHTBAN et al., 2009; FERREIRA et al., 2009). Dependendo da fonte onde é sintetizada, o comprimento das cadeias de celulose na microfibrila varia de 100 a 40.000 nm, (SANDGREEN et al., 2005; FERREIRA et al., 2009). As microfibrilas também são mantidas por interações de Vander Waals entre as cadeias poliméricas que formam zonas com estruturas cristalinas, em sua maioria, bastante ordenadas que não permite a água penetrar no seu interior. As regiões cristalinas da celulose conferem rigidez à parede celular vegetal, tornando mais difícil a degradação da mesma por microrganismos. Já as regiões amorfas são mais facilmente hidrolisadas que as cristalinas, uma vez que possibilita o maior acesso de água e enzimas. As microfibrilas são revestidas pela hemicelulose e imersas em uma fração de lignina (SCHWARZE, 2007).

1.2 Lignina

A lignina é uma macromolécula aromática de elevada massa molecular, formada pela polimerização de unidades fenólicas e alcoóis, que atua como uma estrutura incrustante, conferindo rigidez às paredes celulares vegetais e resistência ao ataque

dos microrganismos. A lignina varia sua composição química de acordo com a fonte de origem. Essa variação determina diferença de susceptibilidade a hidrólise enzimática (SALIBA et al., 2001; SANCHEZ, 2009).

1.3 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo de baixa massa molecular, que possui a função de ligar as microfibrilas de celulose (Coughlan; Hazlewood, 1993). Este polissacarídeo possui uma estrutura complexa de carboidratos, incluindo a xilana (homopolímero), xiloglucana (heteropolímero de D-xilose e D-glucose), glucomanana (heteropolímero de D-glucose e D-manose), galactoglucomanana (hetreopolímero de D-galactose, D-glucose e D-manose) e arabinogalactana (heteropolímero de D-galactose e D-arabinose) (SANCHEZ, 2009; ALBERTON et al., 2009). Estes açúcares estão ligados entre si por ligações glicosídicas β-1,4, formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares. Estas ligações entre os monômeros da hemicelulose são facilmente hidrolisáveis (PÉREZ et al., 2002).

A constituição da hemicelulose se assemelha mais com celulose do que com a lignina, visto que, ela assim como a celulose é constituída de polissacarídeos. A celulose juntamente com a hemicelulose e a lignina formam a parede celular das células vegetais (ALBERTON et al., 2009).

2 I CASCA DE CAFÉ

O café é uma planta de origem africana, pertencente à família das *Rubiaceae,* com mais de 70 espécies, contudo, duas são comercialmente produzidas mundialmente a *Coffe arábica* L. e a *Coffe canefora*. A primeira possui melhores características sensoriais, já a segunda possui maior resistência a pragas (MUSSATO et al., 2011).

Atualmente, segundo o site do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o Brasil é o maior produtor e exportador de café. De acordo com a Balanço Comercial do Agronegócio, em dezembro de 2016, o produto representou 9,8% das exportações brasileiras, movimentando o montante de US$ 600,74 milhões.

Minas Gerais é o maior estado produtor deste grão no Brasil, e registrou um volume recorde de 30,7 milhões de sacas em 2016. O número corresponde a quase 60% da produção nacional, que ficou em 51,3 milhões de sacas de 60 Kg, de acordo com dados do site da Secretaria Especial de Agricultura Familiar e Desenvolvimento Agrário, 2017.

Em setembro de 2017, a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) divulgou a estimativa de produção de 44,77 milhões de sacas, com uma queda de 12,8% em relação a 2016. Este recuo é devido à baixa produtividade da variedade de café arábica que possui um ciclo bienal, apresentando maior produtividade a cada 2 anos. Em Minas Gerais, principal estado produtor de café arábica no país, a CONAB prevê uma queda de 21% na produção com relação a 2016, para 24,04 milhões de saca.

O beneficiamento do café produz grandes quantidades de resíduo sólido (casca ou polpa, dependendo do processo). Segundo Garcia et al., (2004) a palha de café é produzida a uma proporção de 1:1 em peso com relação a produção dos grãos beneficiados. Assim, é possível presumir a quantidade elevada desse resíduo que é gerada, ao se observar o volume de produção atual de café no país.

O processo de beneficiamento do café é feito, em geral, pouco antes da comercialização do produto, e tem por objetivo separar a polpa do grão e deixá-lo pronto para ser comercializado. Esse processo pode ser realizado de duas formas, produzindo diferentes resíduos (MATIELO, 1991). Na via seca, os frutos são secos integralmente e se obtém como resíduo a casca, a polpa e o pergaminho. Este resíduo em geral é denominado de casca e constitui, aproximadamente, 50% do fruto seco (BARTHOLO et al., 1989). Na via úmida, primeiramente é retirada a casca e a polpa, e o resíduo gerado é chamado em geral de polpa, e o grão é colocado para secar com o pergaminho. Em seguida é feita a retirada do pergaminho do grão de café, que representa 12% do fruto seco.

A casca de café é constituída aproximadamente de 37,26 % de celulose, 24,98 % de hemicelulose (BARCELOS, 2001) e 12,38 % de lignina (SOUZA et al., 2001). Segundo SOCCOL (2002) a constituição da polpa é de 57,8% de carboidratos; 9,2% de proteínas; 2,0% de lipídeos; 1,3% de cafeína; 4,5% de taninos e 12,4% de pectina. E de acordo com MURTHY e NAIDU (2012), a polpa também é composta por elementos inorgânicos como nitrogênio, fósforo e potássio, dentre outros. Devido à sua composição, a polpa do café pode ser utilizada na produção de diversos produtos de valor agregado.

Após o beneficiamento do café, nas fazendas produtoras, a polpa é depositada em pilhas, para que ocorra sua secagem e a posterior utilização deste resíduo como adubo orgânico nas lavouras (BONILLA HERMOSA, 2014). Com o uso continuo destas áreas como depósito, pode ocorrer a contaminação do solo e das águas subterrâneas, através dos lixiviados produzidos por este material (BONILLA HERMOSA, 2014). Por causa do elevado nível de umidade, a polpa sofre processos de decomposição e fermentação, produzindo odores desagradáveis e a proliferação de moscas, além de dificultar sua manipulação (BONILLA HERMOSA, 2014).

Com o objetivo de diminuir estes impactos ambientais, têm sido estudadas

alternativas de uso da polpa e casca do café, como alimentação animal, compostagem, produção de enzimas, compostos fenólicos, biogás, ácidos orgânicos, pectina, metabolitos secundários, preparação de meio de cultivo, bioetanol, entre outros (PANDEY et al., 2000).

3 | REAPROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

A grande quantidade de resíduos gerados em todo o mundo, em vários setores produtivos, juntamente com o aumento da consciência ambiental, demonstra que o desafio da humanidade para as próximas décadas é obter um desenvolvimento sustentável, ou seja, equilibrando a produção de bens e serviços, em conjunto com o crescimento econômico, igualdade social e conservação ambiental.

Portanto, atualmente tem sido incentivada a produção de projetos que promovam a sustentabilidade dos sistemas de produção, dando lugar a reutilização de subprodutos, ao invés do que acontecia no passado, quando estes subprodutos eram indesejáveis (SANTOS et al., 2012b).

A reutilização da biomassa lignocelulósica é de grande importância, pois significa agregar valor a esta biomassa, reduzindo seu acúmulo no meio ambiente, além de que os resíduos lignocelulósicos não possuem custos diretos de produção (BON et al., 2008). Assim, o estudo de estratégias de reaproveitamento eficiente desses materiais tem sido o foco de diversas pesquisas no mundo (WADA; IKE; TOKUYASU, 2010).

A biomassa lignocelulósica fornece glicose como fonte de carbono em fermentações industriais, na produção de aminoácidos, antibióticos, enzimas e produtos químicos como etanol de segunda geração (DENG et al., 2011; GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BON, 2010). Contudo, para que a glicose esteja acessível, a biomassa precisa ser submetida a pelo menos dois processamentos, sendo o primeiro um pré tratamento para abrir a cadeia lignocelulósica e remover a lignina; e o segundo, consiste na hidrólise da celulose com a consequente liberação de açúcares fermentescíveis (GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BON, 2010; SU et al., 2012).

As enzimas capazes de hidrolisarem a celulose a açúcares fermentescíveis, denominadas de celulases, já vem sendo produzidas e estudadas. Contudo, a produção e purificação destas enzimas é um processo de custo elevado, o que torna a utilização dessas ainda inviável. Assim, é importante investir em pesquisas para avaliar cepas microbianas com um bom desempenho na produção de celulases, sendo esta uma estratégia viável para a obtenção de enzimas a um baixo custo. Outra estratégia que já vem sendo avaliada é a utilização de vários resíduos lignocelulósicos como substratos em processos fermentativos para redução dos custos de produção (DESWAL et al., 2011). Isso representa uma alternativa economicamente viável, em virtude da grande

abundância desta matéria prima, além de diminuir os impactos ambientais provocado pelo acúmulo desta biomassa na natureza (CUNHA et al., 2012; SOCCOL et al., 2010).

4 I CELULASES

As celulases são enzimas produzidas por uma grande diversidade de microrganismos durante seu crescimento em materiais celulósicos (SZIJÁRTÓ et al., 2004). A degradação desses materiais lignocelulósicos, é ocasionada pela ação de três classes principais de enzimas, acarretando a hidrólise da celulose a glicose (Kuhad; Singh; Eriksson, 1997). Estas classes de enzimas hidrolíticas compreendem as endo-1,4- β-glucanases (EC 3.2.1.4), que quebram ligações internas da fibra celulósica; as exo- 1,4-β-glucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), que atuam na região externa da celulose e as 1,4-β-glicosidases (EC 3.2.1.21) que clivam oligossacarídeos solúveis em glicose (SINSABAUGH; LIPTAK, 1997; UBHAYASEKERA et al., 2005; LYND et al., 2002).

As enzimas do complexo celulolítico quando atuam conjuntamente, apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras. Esse efeito é conhecido como sinergia. São conhecidas pelo menos três formas de sinergia entre as celulases (LYND et al., 2002; BHAT; BHAT, 1997): sinergia EnG-ExG - a endoglucanase, atuando nas regiões amorfas da fibra, disponibiliza terminais redutores e não redutores para atuação de CBH I e CBH II, respectivamente; sinergia ExG-ExG - as CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação da endoglucanase; sinergias ExG-BG e EnG-BG - como seus produtos de hidrólise, a celobio-hidrolase e a endoglucanase liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a β-glicosidase. Na Figura 3, pode-se visualizar o modo de ação sinérgica do complexo enzimático na hidrólise da fibra de celulose.
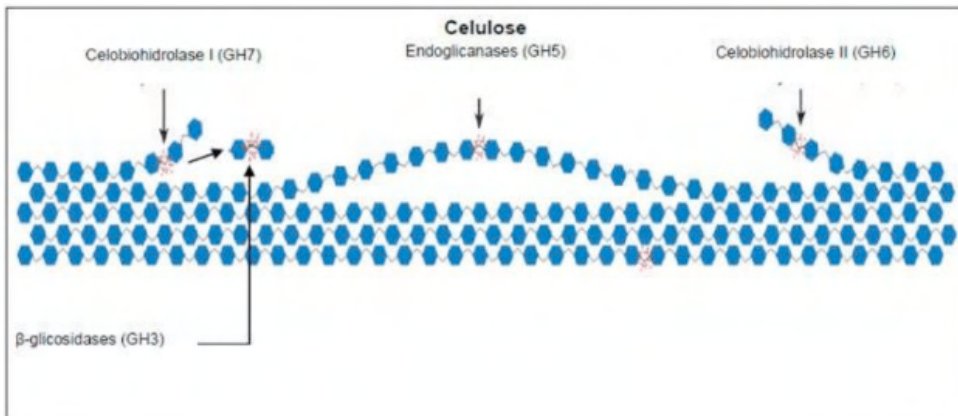
Figura 3: Mecanismo da ação de enzimas que atuam na degradação da celulose (Cantarel et al., 2009; Van den Brink; Vries, 2011; Glass et al., 2013).

Esse modelo de biodegradação da celulose é verdadeiro para a maioria dos fungos. Entretanto, existem algumas espécies deficientes na produção de exo-1,4-β-glucanases e β-glicosidase, ficando limitada a biodegradação completa do polímero pela via enzimática (KUBICEK, 1981).

As celulases e outras glicosídeo hidrolases (GHs) foram classificadas em famílias e estão estruturalmente relacionadas no banco de dados CAZy, baseadas nas sequências de similaridades de aminoácidos, tão bem quanto, nos padrões de seus resíduos hidrofóbicos, do seus enovelamentos e mecanismos que tem sido constantemente atualizado nesse banco desde 1988 (Levasseur et al., 2013).

4.1 Endoglucanases

São enzimas classificadas como EC 3.2.1.4, que possui nome de 1,4-β-D-glucana- 4-glucano-hidrolase, segundo a IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. Tais enzimas iniciam a hidrólise sendo responsáveis por clivar aleatoriamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização. Assim, novos terminais são formados, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente) (LYND et al., 2002).

As endoglucanases possuem o sítio ativo com a conformação de uma chave, o que possibilita a ação da enzima ao longo de toda cadeia de celulose e reduzindo o seu grau de polimerização de maneira considerável (SALOHEIMO et al., 1997). Elas atacam mais facilmente regiões de menor organização estrutural, por possuírem cadeias que não estão envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes, quanto as que ocorrem nas regiões micro cristalinas, expondo assim as ligações mais internas da cadeia de celulose (ELISAHVILI, 1993).

Para a avaliação da atividade dessa enzima, é muito utilizado como substrato a carboximetilcelulose (CMC), pois apresenta alto grau de polimerização e baixa cristalinidade (CAO; TAN, 2002).

4.2 Exoglucanases

As exoglucanases são compostas por celobio-hidrolases (CBH) e glucano-hidrolases (GH). As glucano-hidrolases (EC 3.2.1.74), em que o nome sistemático é 1,4-β-D-glucana-glucano-hidrolases, possuem a capacidade de liberar glicose diretamente do polímero (LYND et al., 2002). As celobio-hidrolases (EC 3.2.1.91) possuem o nome sistemático 1,4-β-D-glucana-celobio-hidrolases e podem ser divididas em dois tipos: enzimas do tipo I (CBH I), que hidrolisam terminais redutores e enzimas do tipo II (CBH II), que hidrolisam terminais não redutores da celulose insolúvel ou micro cristalina. Elas liberam glicose e, principalmente, celobiose como produto. Essas enzimas em geral sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise a celobiose (AWAFO, 1997).

As celobio-hidrolases possuem seu sítio ativo em forma de túnel, por onde a cadeia de celulose penetra e sofre hidrólise de suas ligações glicosídicas terminais, liberando na sua maior parte celobiose. O CBM (módulo de ligação de celulose) é um domínio enzimático que é constituído por 35 aminoácidos na CBH I e 44 na CBH II, que promovem a adsorção da proteína ao substrato, permitindo melhor aproximação do polímero de celulose ao sítio ativo (HUI; WHITE; THIBAULT, 2002). Essa adsorção ocorre por meio da interação de resíduos de tirosina do CBM com as unidades de glucopiranose presentes na celulose (MARTINS, 2005).

4.3 β-glicosidases

As enzimas β-glucosidase, cujo nome sistemático é β-glicosídeo gluco-hidrolase (EC 3.2.1.21), são enzimas que apresentam importantíssima contribuição para a eficiência da hidrólise da celulose. Possuem a função de hidrolisar a celobiose e oligossacarídeos solúveis com grau de polimerização menor que sete unidades, gerada pelas celobiohidrolases e endoglucanases em glicose, já que a celobiose é um potente inibidor competitivo das celobiohidrolases (MEDVE, 1997; MUÑOZ et al., 2001), sendo seu acúmulo no meio reacional fator limitante para a incompleta hidrólise

do polímero de celulose. As β-glucosidases também sofrem inibição por seu produto de hidrólise, neste caso a glicose, porém são induzidas pela presença de celobiose (AWAFO, 1997), sendo este também um efeito sinérgico.

4.4 Aplicação das celulases

A utilização de celulases em processos industriais iniciou-se por volta da década de 80, com a adição dessas enzimas na ração animal (CASTRO et al., 2010). Sendo que esta, possuíam a finalidade de aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos, resultando em uma melhor assimilação dos nutrientes e, portanto, no aumento da produção de leite e ganho de peso pelos animais (BHAT, 2000).

Data também da década de 80 a primeira utilização de enzimas celulases, na indústria têxtil, quando Kao introduziu uma celulase em seu detergente alcalino Attack® (SCHAFER et al., 2005). Nessa indústria, estas enzimas são muito empregadas nos processos de biopolimento que é a desfibrilação de tecidos como: algodão, linho, lã e viscose (CASTRO, 2010). Outro benefício muito interessante decorrente da ação destas enzimas, refere-se ao realce e brilho das cores do tecido (MUSSATTO et al., 2007). Em tecidos *jeans*, as celulases são empregadas na remoção do excesso de corantes, processo denominado bioestonagem, o qual danifica menos as fibras do tecido quando comparado ao método tradicional que utiliza pedra-pomes além de conferir aspecto de desbotado mais uniforme.

Na indústria de alimentos, as celulases começaram a ser empregadas como insumo, com a finalidade de melhorar as propriedades sensoriais de massas. Nessa mesma indústria, as celulases foram aplicadas no processamento de bebidas, com o objetivo de promover a clarificação de sucos de frutas e vinhos e a manutenção de uma reologia estável do produto final (CASTRO et al., 2010).

Na indústria de papel, as celulases são empregadas no processo de fabricação da polpa de celulose, o qual é realizado o refino da mesma, sendo removidos materiais lenhosos que prejudicam a qualidade da polpa. A utilização de celulases torna possível a economia de, no mínimo, 20% de energia. Estas enzimas agem na modificação das propriedades das fibras, tornando possível o seu desenchague, aumentando a velocidade de produção do papel (BHAT, 2000). As celulases também são aplicadas na reciclagem de papel, atuando na sua descoloração e no tratamento de águas residuais desta indústria (GEORGE et al., 2001).

4.4.1 Industria de bioetanol

A preocupação ambiental tem feito muitos países investirem em fontes de energias alternativas e sustentáveis. Assim, a produção de etanol de segunda geração, a partir da utilização de resíduos lignocelulósicos, tem se mostrado uma tecnologia

promissora, uma vez que, representa uma fonte alternativa aos combustíveis fósseis. Como se sabe, os combustíveis fósseis provêm de uma fonte não renovável, sendo inevitável seu esgotamento em poucos anos, tornando mais necessária a busca por novas fontes de energia (BINOD et al., 2010; LIM et al., 2012; LIU et al., 2012).

A produção de etanol celulósico exerce um papel fundamental na redução dos impactos ambientais, pois reduz a emissão de gases do efeito estufa, devido a não liberação do carbono que está preso no subsolo, diminuindo as mudanças climáticas ocasionadas por estes gases (LIU et al., 2012; SOCCOL et al., 2011) e contribui para agregar valor a biomassa lignocelulósica, reduzindo os impactos ambientais gerados pelo acúmulo da mesma no meio ambiente (LIN; TANAKA, 2006).

A utilização da biomassa lignocelulósica na produção de etanol, apresenta a vantagem de não competir por terras para a produção de alimentos, pois esta matéria-prima amplamente disponível, consiste de resíduos de outras indústrias (LIM et al., 2012; MORAIS et al., 2012; SANTOS et al., 2012b; SINGH; SINGH; BISHNOI, 2010; SINGHANIA, 2011), diferentemente do que ocorre na produção do etanol de primeira geração, que utiliza a cana de açúcar e culturas de grãos como o milho, na produção do etanol (LIU et al., 2012).

Atualmente, diversos estudos envolvendo a produção de etanol celulolítico estão focados em desenvolver um processo que seja economicamente mais viável, principalmente com relação as etapas de pré-tratamento e hidrólise da biomassa lignocelulósica (LIU et al., 2009; SANTOS et al., 2012b).

Essa biomassa é constituída de uma rede de lignina e hemicelulose que recobre a celulose, lhe conferindo uma estrutura altamente resistente à hidrólise. Assim, a etapa de pré-tratamento possui a função de quebrar esta rede, removendo a lignina e a hemicelulose (BINOD et al., 2011; MAEDA et al., 2012). Com a quebra desta rede, ocorre o aumento do número dos poros e da área superficial dos resíduos (MONTE; BRIENZO; MILAGRES, 2011), deixando a celulose mais disponível para a etapa de hidrólise (SU et al., 2012).

Como mencionado anteriormente, a etapa de hidrólise da celulose pode ser realizada tanto por hidrólise química quanto por hidrólise enzimática. Contudo, a hidrólise enzimática proporciona uma série de vantagens em relação a hidrólise química, uma vez que, opera em condições brandas de temperatura, pH e pressão osmótica. Além do que, a reação enzimática é seletiva e não libera produtos de degradação de açúcar, tais como furfural e hidroximetilfurfural gerados na hidrólise ácida, que diminuem a concentração de polissacarídeos, provocando a diminuição da eficiência do processo de fermentação (CAMASSOLA; DILLON, 2012; MAEDA et al., 2012).

As enzimas utilizadas para o processo de hidrólise da celulose são as celulases.

Contudo, sua utilização na industrial ainda é limitada pelo seu elevado custo de produção. Por essa razão, inúmeros estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver novos bioprocessos, menos onerosos na produção de enzimas celulolíticas, assim como bioprospectar enzimas com maior potencial celulolítico que as disponíveis (BAEK et al., 2012; BANSAL et al., 2012; CUNHA et al., 2012; PARK; NARUSE; KATO, 2011; SINGHANIA, 2011; SINGHVI et al., 2011), a fim de tornar a produção de etanol de segunda geração mais viável em um futuro próximo (HIDENO et al., 2011; PARK; NARUSE; KATO, 2011).

5 I MICRORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASES

Na natureza existem diversos microrganismos produtores de enzimas celulases, como bactérias anaeróbicas (*Clostridium,* etc) e aeróbicas (*Cellulomonas,* etc), actinomicetos (*Streptomyces*), fungos filamentosos (*Trichoderma*, *Aspergillus,* etc), plantas (*Fragaria*) e animais (moluscos e insetos) (LYND et al., 2002; PALOMER et al., 2004). Entretanto, poucos fungos e bactérias produzem altos níveis de celulase extracelular capaz de solubilizar a celulose cristalina (BHAT, 2000). Assim, torna-se necessária a busca por novos microrganismos, com uma boa capacidade de produção e secreção de celulases, para alcançar uma produção com um maior potencial e mais diversificada (HIDENO et al., 2011).

5.1 Fungos do Gênero *Fusarium*

As espécies desse gênero apresentam colônias granulosas ou cotonosas, geralmente de cor rosa-avermelhada, púrpura, branca ou amarela (KONEMAM et al., 2001). Possuindo micélio e conidióforos hialinos, podendo apresentar ramificações que terminam em tufos, e que originam dois tipos de conídios: os microconídios e os macroconídios. Microconídeos são produzidos em cadeias ou isoladamente formando “cabeças” e não apresentam septos (Figura 4-a). Ao contrário, os macroconídios são grandes, pontiagudos, falciformes, e possuem um ou mais septos transversais (Figura 4- b). Os clamidósporos são outros tipos de estruturas de resistência muito comuns nos fungos deste gênero (Figura 4-c). Estes são formados a partir de células preexistentes de hifas que sofrem espessamento e aumento (KONEMAM et al., 2001; TORTORA et al., 2012).
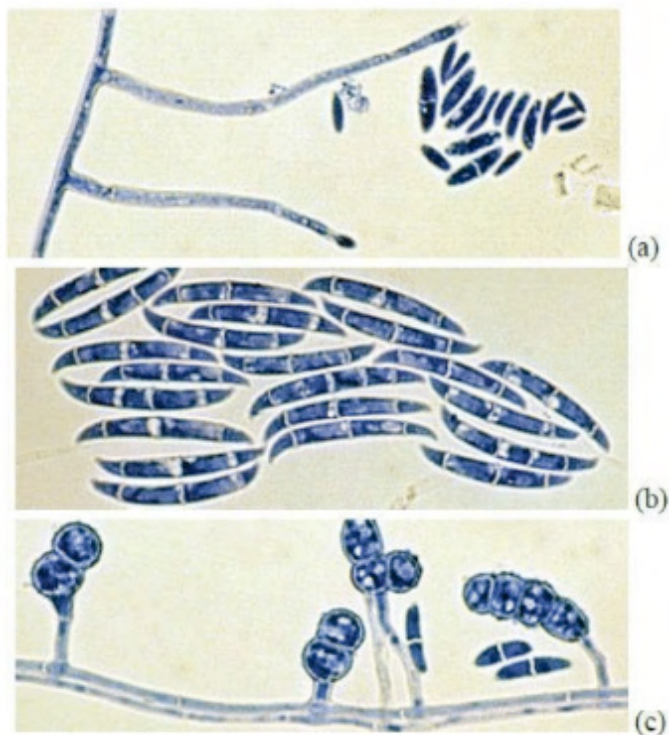
Figura 4- Preparação microscópica de *Fusarium solani,* sendo: (a) microconídios; (b) macroconídios e (c) clamidósporos (MYCOLOGY ONLINE, 2014).

Esse gênero possui grande grau de diversidade em relação a características morfológicas, fisiológicas e ecológicas. São encontrados representantes desse gênero na maioria dos nichos ecológicos, nas mais diferentes regiões geográficas do planeta BURGESS et al., 1997). Segundo Milanesi (2009), os fungos desse gênero podem colonizar ramos, folhas, inflorescências e frutos por meio dos seus conídios, que são disseminados pelo ar, pela água e pela diversidade de espécies existentes nesse ambiente. Várias espécies do gênero *Fusarium* são fitopatogênicas, sendo associadas a importantes doenças que causam grandes prejuízos para a agricultura, como o mal-do- panamá em bananeiras, podridão do caule de café e a mancha-do-fusário em soja, entre outras (MILANESI, 2009).

5.2 Fungos do Gênero *Mucor*

Fungos do gênero *Mucor* apresentam rápido crescimento em ágar, à temperatura ambiente, ocupando toda a superfície da placa em 2 a 3 dias, apresentando micélios aéreos. Formam colônias lanosas, branco-acinzentada, marrom ou marrom-acinzentado, sem bordas definidas (KONEMAM *et al.*, 2001).

O gênero *Mucor* apresenta esporangióforos que podem ser simples ou ramificados e formam esporângios globulares apicais suportados e elevados por uma columela. As espécies de *Mucor* diferenciam-se dos gêneros *Absidia, Rhizomucor,* e *Rhizopus* pela forma e inserção da columela, e por não possuírem rizoides (Figura 5). Em cultura líquida, sob condições anaeróbicas, algumas espécies crescem na forma de levedura.
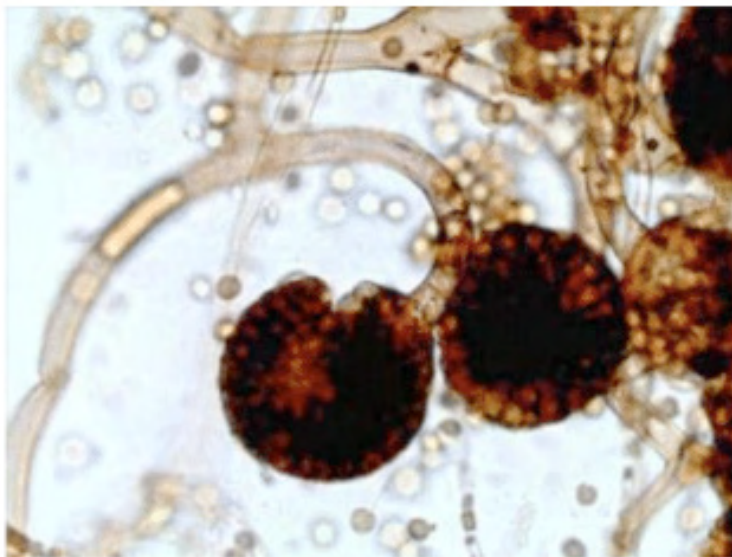
Figura 5: Estruturas reprodutivas de *Mucor* sp. em preparação microscópica (OLIVEIRA, 2013).

A espécie *Mucor circinelloides* é um fungo filamentoso não patogênico, apresenta a característica de ser dimórfico, sofrendo variações morfológicas de acordo com as condições nutricionais e temperatura de incubação (LUBBEHUSEN et al., 2003).

Com relação às condições de cultivo de *M. circinelloides*, a melhor faixa de pH citada para o crescimento deste microrganismo é variando de 5 a 7 e temperatura de incubação na faixa de 25 °C a 30 °C. O mesmo fungo foi relatado na literatura por apresentar a capacidade de assimilar diferentes tipos de fontes de carbono, como glicerol, xilose e arabinose e aproveitar diretamente os polissacarídeos, como amido e celulose para seu crescimento (XIA et al., 2011).

Na produção de enzimas, há alguns estudos desta linhagem na produção de lipase (STRUSZCZYK et al., 2009), β-glucosidase e endoglucanases (BAFFI et al., 2012). O *M. circinelloides* é conhecido por produzir enzimas celulolíticas extracelulares (BOTHA et al., 1997), que podem auxiliar na degradação de polissacarídeos insolúveis

contidos em amostras de linhaça (MITRA et al., 2012). Além disso, *Mucor* sp. também foi reportado como um micro-organismo que tem a capacidade de secretar celulases (TAKÓ et al., 2010).

A espécie *M. circinelloides* possui uma alta capacidade para a produção e secreção de enzimas do complexo celulolítico como endoglucanase, celobiohidrolase, β- glucosidase, xilanase e β-xilosidase (Takano; Hoshino, 2012), que possuem a capacidade de converter vários materiais celulósicos e hemicelulósicos a glicose e xilose (Takano; Hoshino, 2012).

6 I PRODUÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Os fungos filamentosos possuem um papel muito importante na natureza, pois degradam a celulose e lignina, sendo por tanto fundamentais para a manutenção do ciclo do carbono. A capacidade que estes fungos possuem em degradar eficientemente polímeros vegetais, fornece tópicos para pesquisas, e a possibilidade da aplicação dos mesmos na indústria (ARO et al., 2005).

Há muito tempo os fungos são utilizados na produção de bebidas alcoólicas, biomassa, manufatura de compostos terapêuticos e na produção de compostos orgânicos simples (PAPAGIANNI, 2004). E atualmente vem aumentando o número de produtos comerciais produzidos por fungos. Várias espécies de fungos filamentos são utilizados como bons produtores de inúmeras enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos e outros metabolitos importantes comercialmente.

Na produção de enzimas fúngicas, é importante observar: se os microrganismos são capazes de crescer em substrato de baixo custo; se a produção de enzimas ocorre em ritmo elevado, constante e em curto espaço de tempo; se os métodos para a recuperação dessas enzimas são simples e de baixo custo; e se a preparação enzimática obtida apresenta estabilidade (FELLOWS, 1994).

Os meios de cultivo a serem utilizados para se obter as enzimas microbianas podem ser substratos sólidos, definidos como substratos sem a presença de água livre, sendo está ligada ao substrato formando camada na superfície das partículas (Raimbault, 1998), como de exemplo de substratos sólidos podem ser citados: a casca do café, bagaço de cana ou outros resíduos agroindustriais (LOPEZ et al., 2013). Ou podemser obtidos por cultivo submerso, empregando substratos líquidos. Esses meios devem conter uma fonte de carbono, de nitrogênio e dependendo do microrganismo é necessário o acréscimo de fatores de crescimento e micronutrientes (SANT'ANNA JÚNIOR, 2001).

O cultivo submerso é muito utilizado na produção industrial de enzimas, pela facilidade de manipulação e controle do processo. Porém, é importante observar o

acúmulo de produtos finais, pois estes podem ser inibidores do crescimento celular e da formação de produtos desejados (SRINIVASA et al., 2001).

O cultivo submerso exige a preparação antecipada de um inóculo que é obtido nas mesmas condições de incubação que o cultivo final para produção da enzima. (FARIA, 2014). Após a fermentação, as enzimas extracelulares são recuperadas do caldo fermentado por meio de etapas de separação e purificação, removendo as substâncias tóxicas e ou metabólitos indesejáveis. Neste caso, as enzimas podem ser separadas do meio por centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação por membranas, cromatografia ou pela combinação de outros métodos. Já para o caso em que as enzimas são intracelulares, a recuperação destas torna-se mais difícil, sendo necessária a etapa de rompimento celular, onde a enzima de interesse deve ser separada e purifica de um meio que contêm diversos contaminantes. Isto, além de tornar a etapa de separação e purificação mais difícil, torna mais cara em relação a fermentações onde as enzimas são secretadas no meio (FARIA, 2014).

Os fungos que possuem um grande potencial para produção de enzimas são em geral isolados em seu habitat natural como frutos, materiais vegetais, solo, e uma infinidade de substratos naturais; o que permite o isolamento e a seleção de linhagem fúngicas de acordo com interesses biotecnológicos. Assim, a bioprospecção de fungos filamentosos isolados a partir da casca do café exibe uma perspectiva de grande importância, uma vez que, as cepas isoladas poderão produzir enzimas com aplicação em diversos processos biotecnológicos voltados para a indústria alimentícia, têxtil, química e de biocombustíveis. Dentre as enzimas que possuem um grande interesse biotecnológico produzidas por fungos, destacam-se: as celulases, lacases, xilanases, pectinases e amilases (Esposito & Azevedo, 2010).

OBJETIVOS

1 I OBJETIVOS GERAIS:

Avaliar a produção de enzimas celulases por fungos filamentosos isolados da casca de café, bem como caracterizar o pH e a temperatura ótima dessas enzimas e avaliar a aplicação das mesmas na casca de café pré-tratada.

2 I OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a produção de celulases em meio sólido enriquecido com carboximetil-celulose (CMC);
- Avaliar a atividade da enzima endoglucanase dos fungos;
- Avaliar a atividade da enzima β-glicosidase dos fungos;
- Caracterizar as enzimas endoglucanase e β-glicosidade frente a diferentes valores de pH e temperatura;
- E avaliar a aplicação do extrato enzimático bruto dos dois fungos em conjunto na casca de café pré-tratada.

MATERIAL E MÉTODOS

1 I AS CULTURAS DOS FUNGOS

No presente trabalho, utilizou-se duas colônias de fungos isoladas previamente da casca de café, provenientes de fazendas produtoras de café localizadas no Estado de Minas Gerais.

As colônias de fungos foram isoladas da casca de café, em um trabalho anterior, realizado por Natividade (2014). Segundo o qual, dois frutos de café em coco foram homogeneizados com 10 mL de solução salina 0,85%. A partir desta, realizou-se diluições seriadas de 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}. Em seguida retirou-se 100 μl de cada diluição e estes foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram incubadas por 7 dias a 28°C. Após o crescimento dos fungos, as colônias foram selecionadas, isoladas e posteriormente repicadas em placas de Petri contendo meio BDA. Em um trabalho subsequente, os fungos isolados da casca de café foram identificados, por técnicas de biologia molecular, por Pereira em (2017). No presente trabalho, utilizou-se os fungos isolados da casca de café, pertencentes as espécies *Fusarium* sp. e *Mucor circinelloides strain,* espécies identificadas conforme Pereira (2017), para avaliar o potencial de produção das enzimas celulases por estes fungos.

As culturas desses fungos foram mantidas em placas contendo meio “Yeast Malt Ágar” (YMA). A cada trinta dias aproximadamente, estas culturas foram inoculadas em novas placas, incubada a 28 °C e posteriormente armazenadas a 4°C. O meio (YMA) foi preparado utilizando glicose 1%; extrato de levedura 0,3%; extrato malte 0,3%; peptona 0,5%; ágar 2% e água destilada.

2 I AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA DOS FUNGOS

Para a análise qualitativa das enzimas celulases, foram realizadas diluições seriadas do inóculo dos fungos, utilizando solução de água peptonada composta por 1g/L de peptona e 8,5 g/L de cloreto de sódio.

Em seguida, o inóculo foi realizado com o homogeneizado das diluições de 1/10 e de 1/100 de cada fungo, em placas contendo meio sintético com (CMC) 1%. Este meio foi composto por: $NaNO_3$: 3,0 g. L^{-1}; $(NH_4)_2SO_4$: 1 g. L^{-1}; $MgSO_4$: 0,5 g. L^{-1}; KCl: 0,5 g. L^{-1}; $FeSO_4.7H_2O$: 10,0 mg. L^{-1}; CMC: 10,0 g. L^{-1}; Ágar: 20,0 g. L^{-1} (BORTOLAZZO, 2011). O inóculo foi feito em dois pontos da placa, sendo colocada uma gota do homogeneizado da diluição seriada em cada ponto da placa. Posteriormente, os fungos foram incubados a 28°C por 5 dias.

Após o período de incubação, com o objetivo de visualizar o halo de hidrólise, a superfície da placa foi coberta com solução de Lugol 10% (v/v) por 5 minutos (KASANA et al., 2008).

3 I PRODUÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Na avaliação da atividade enzimática em meio líquido, o mesmo foi constituído por KH_2PO_4 0,7%; NaH_2PO_4 0,4%; $MgSO_4$ 0,02%; $(NH_4)_2SO_4$ 0,1%, extrato de levedura 0,06% e (CMC) 2% (p/v) (SINGH et al., 2009) modificado, o qual foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. O inóculo foi realizado retirando-se três discos de 1 cm de diâmetro de uma placa de Petri contendo colônias do fungo. Os discos foram transferidos para um *Erlenmeyers* contendo o meio. O mesmo foi inserido em um *shaker* a 28 °C e 180 rpm. Em intervalos de 24 horas, as amostras foram assepticamente coletadas e centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos, a fim de obter o extrato enzimático bruto das mesmas. O inóculo foi feito em duplicata para os dois fungos em estudo.

4 I ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Para determinar as atividades enzimáticas, foram realizadas quantificações dos produtos de degradação de seus substratos sintéticos.

4.1 Avaliação da atividade da enzima endoglucanase

Esta análise foi feita por meio da dosagem de açúcares redutores, liberados pela degradação da (CMC), quantificada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), descrito por Miller (1959) em ensaio adaptado por Ghose (1987).

O reagente DNS foi constituído de 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico; 19,8 g de hidróxido de sódio; 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio; 7,6 mL de fenol (fundido); 8,3 g de metabissulfito de sódio, diluídos em água destilada até o volume de 1500 mL.

Assim, em tubos de ensaios, foram colocados 250 μL de uma solução de tampão acetato 0,1M pH 4,8 com (CMC) 2 % (p/v) e 250 μL do extrato enzimático bruto. Para o controle, acrescentou em substituição do extrato enzimático, 250 μL do mesmo tampão. Os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 750 μL da solução de (DNS) nos mesmos, e foram direcionados novamente para um banho fervente a 100°C por 5 minutos, e após à um banho de gelo por mais 5 minutos. Finalmente, os tubos foram completados com 3,75 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, Bioespectro SP 22®, a 540 nm.

Para a construção da curva padrão, foram utilizadas soluções de glicose com concentrações variando entre 0,1 a 1,0 g/L. Nos tubos de ensaios foram adicionados 750 μL do reagente de DNS a 0,5 mL dessas soluções com concentrações diferentes de glicose. Esses tubos foram levados à fervura por 5 minutos e em banho de gelo por

mais 5 minutos. Posteriormente, os tubos foram completados com água destilada para um volume de 5 mL (GHOSE, 1987). As leituras foram realizadas a 540 nm. A partir da curva padrão de glicose previamente construída, os valores de absorbância foram convertidos em quantidades equivalentes de glicose, considerando que 1 Unidade Internacional (IU) equivale a 1 µmol de glicose liberada por minuto (BASSO et al., 2010). O experimento foi realizado em duplicata.

4.2 Avaliação da atividade da enzima β-glicosidase

A avaliação da atividade β-glicosídica foi realizada utilizado o substrato *p*-nitrophenil-β-D-glicopiranosídeo (pNPβG). Inicialmente adicionou-se 120 *µ*L da solução de (pNPβG) a 0.01 M e 1,08 mL de tampão fosfato-citrato 0,1 M pH 5,0 nos tubos de ensaios. Em seguida, acrescentou-se 0,3 mL dos extratos enzimáticos e para o controle 0,3 mL do mesmo tampão. Todos os tubos foram colocados em banho-maria a 30°C por 30 minutos. A reação foi interrompida acrescentando 1,5 mL da solução de bicarbonato de sódio a 0,5 M. A leitura foi realizada a 420 nm.

Define-se uma unidade internacional (IU) de atividade de β-glicosidase como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 µmol de *p*-nitrophenol do substrato por minuto. Deste modo, para a quantificação, construiu-se a curva padrão utilizando água, bicarbonato de sódio e *p*-nitrophenol com concentrações variando entre 20 a 160 µmol. mL^{-1}. Todo o experimento foi realizado em duplicata.

5 I CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Este estudo foi realizado a fim de verificar o ponto ótimo destas enzimas com relação a temperatura e pH.

5.1 Efeito da temperatura na atividade enzimática

As atividades das enzimas Endoglucanase e β-glicosidase foram avaliadas em temperaturas de 30°C a 70°C. Os ensaios foram realizados conforme descrito anteriormente, alterando-se apenas a temperatura na qual o ensaio foi incubado, seguindo os protocolos referentes para cada enzima.

5.2 Efeito do pH na atividade enzimática

A especificidade da enzima foi estudada frente a diferentes valores de pH de 4,0 a 8,0. A variação no pH foi realizada substituindo os tampões referentes a cada ensaio, pelos tampões fosfato-fosfato a 0,2 M para caracterização das enzimas Endoglucanase e β-glicosidase respectivamente.

6 I AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DAS ENZIMAS NA CASCA DE CAFÉ PRÉ-TRATADA

Para avaliar a atividade das enzimas dos fungos, na degradação da celulose presente na casca de café, utilizou-se a casca de café pré-tratada, a qual passou por etapas de limpeza, trituração, secagem, além de realização dos pré-tratamentos ácido e pré-tratamento alcalino. No pré-tratamento ácido, foi utilizado ácido sulfúrico diluído, misturado com a casca de café em frascos *Erlenmeyers* de 2 L e inceridos em autoclave para iniciar o processo de hidrólise e fracionamento da estrutura fibrosa do material lignocelulósico a temperatura de 121ºC e concentração 10% (p/v), por 10 minutos (SANTOS, 2015c). Em seguida, a casca foi neutralizada. Por fim, foi feito o pré- tratamento alcalino, o qual utilizou hidróxido de sódio a 10% (p/v), a 121 ºC por 30 minutos, condições otimizadas em estudos anteriores (DURSO, 2016).

Os fungos foram incubados em meio líquido conforme descrito no item 4.2. “Produção de extratos enzimáticos brutos por fermentação submersa”, e no sexto dia de fermentação, os extratos enzimáticos foram filtrados em gaze de algodão e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos.

Em seguida, transferiu-se para um *Erlenmeyers*, 50 mL de extrato enzimático bruto do fungo *Fusarium* sp., mais 50 mL de extrato enzimático bruto do fungo *Mucor circinelloides strain* e mais 2% de casca de café previamente tratada, e incubou em um *shaker* a 50° C e 180 rpm. Em intervalos de 24 horas, as amostras foram recolhidas.

Em um tubo de ensaios foi acrescentado 0,5 mL da amostra, e para o branco, adicionou-se em outro tubo de ensaio 0,5 mL de tampão acetato a 0,1M e pH 4,8. Em seguida, adicionou-se 750 μL do reagente de DNS. Esses tubos foram levados à fervura por 5 minutos e em banho de gelo por mais 5 minutos. Posteriormente, os tubos foram completados com água destilada para um volume de 5 mL (GHOSE, 1987). As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro, Bioespectro SP 22®, a 540 nm. Em seguida, convertidas em concentrações de glicose, através de uma curva padrão de glicose. Todo o procedimento foi realizado assepticamente e em duplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

1 I CONSERVAÇÃO DAS CULTURAS DOS FUNGOS

Os fungos isolados da casca de café foram inoculados em meio YMA e após cinco dias de incubação, como mostra a Figura abaixo, na qual o fungo 1 pertencente a espécie *Fusarium* sp. e o fungo 2 a espécie *Mucor circinelloides strain,* segundo o trabalho de Pereira (2017). Macroscopicamente o fungo 1, apresenta coloração desuas colônias branco levemente amarelada. Já o fungo 2, apresenta a coloração acinzentada.
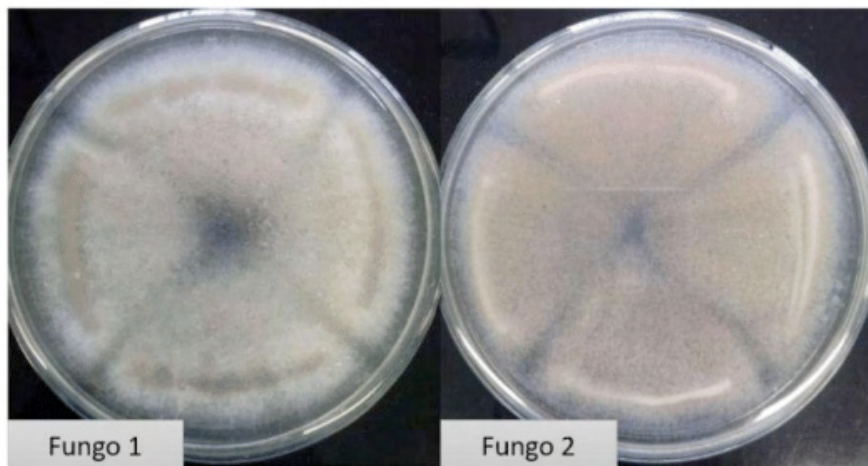
Figura 6: Cepas dos fungos após cinco dias de crescimento em meio Y.M.A.

2 I AVALIAÇÃO QUALITATIVA DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Na presente avaliação, foi testada a interação do corante (Lugol) com polissacarídeos degradados pela ação das enzimas extracelulares liberadas pelo fungo. Segundo Nunes (2010), esta interação evidencia a formação de halos de coloração clara em torno das colônias, indicando que a CMC contida no meio de cultivo sofreu hidrólise enzimática.

Assim pela Figura 7, foi possível notar pelas manchas claras revelas por meio da interação do Lugol com os polissacarídeos degradados no meio, que fungos inoculados cresceram no mesmo meio contendo CMC como única fonte de carbono, demostrando que os mesmos produzem enzimas celulolíticas.
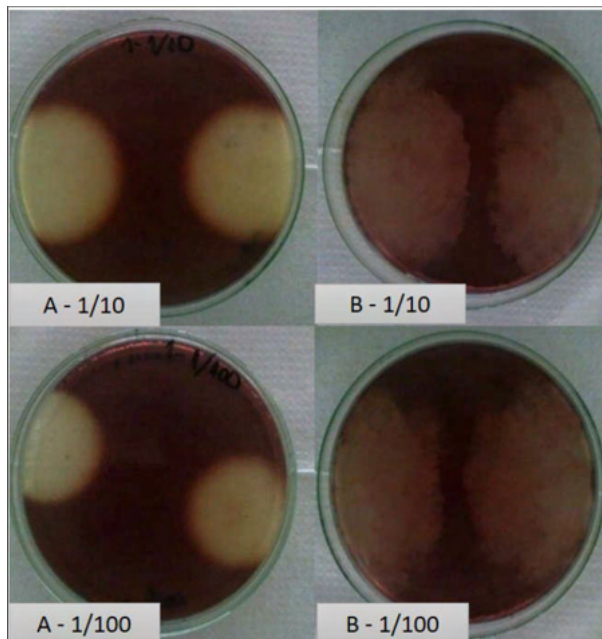
Figura 7: Análise qualitativa dos fungos (A) *Fusarium* sp. e (B) *Mucor circinelloides strain*, após 5 dias de incubação em meio CMC 1%, corados com Lugol 10%.

3 I PRODUÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Para os ensaios enzimáticos, a caracterização das enzimas e avaliação da aplicação das enzimas na casca de café pré-tratada, foi utilizado o método de fermentação submersa.

4 I ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Os ensaios enzimáticos tiveram como parâmetro a quantidade de enzima extracelular produzida pelos microrganismos, sendo quantificado pelos seus produtos de hidrólise.

4.1 Avaliação da atividade da enzima endoglucanase

A atividade endoglicolítica foi avaliada utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), descrito por Miller (1959), em ensaio adaptado por Ghose (1987), o qual determina a dosagem de açúcares redutores liberados pela degradação da (CMC).

A partir deste método obteve-se os seguintes perfis de atividade enzimática da enzima endoglucanase, para os fungos dos gêneros *Fusarium* e *Mucor* respectivamente, segundo as Figuras 8 e 9.
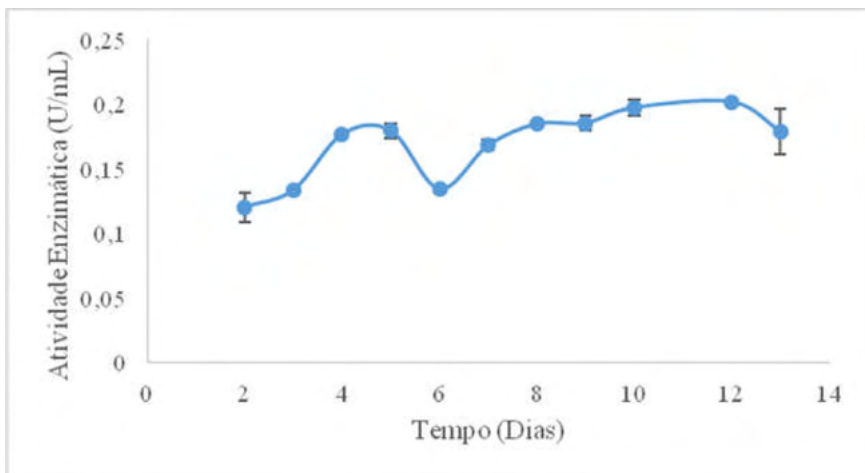
Figura 8: Produção de endoglucanase por *Fusarium* sp. em função do tempo de cultivo.
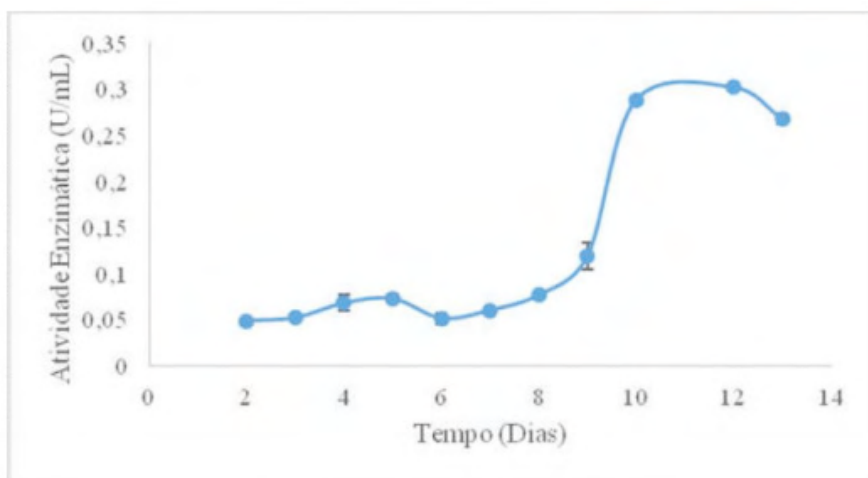
Figura 9: Produção de endoglucanase por *Mucor circinelloides strain* em função do tempo de cultivo.

Pela Figura 8, foi possível observar que o fungo *Fusarium* sp. alcançou atividade endoglicolítica máxima de 0,2017 ± 0,0008 U/mL no décimo segundo dia de fermentação. No trabalho realizado por Moraes et al. (2016), utilizando CMC 1% como substrato, obteve um índice de atividade endoglicolítica de 0,41 U/mL para o isolado 15 pertencente a espécie *Fusarium oxysporum*, no sétimo dia de incubação.

Já na Figura 9, onde foi avaliada a atividade endoglicolítica do fungo *Mucor circinelloides strain*, observou-se nos primeiros dias um perfil constante, apresentando um crescimento a partir do nono dia de fermentação e alcançando uma atividade

enzimática máxima de 0,3016 ± 0,0018 U/mL, no décimo segundo dia. No trabalho realizado por Souza (2015), utilizando CMC 1% como substrato, obteve um índice enzimático de 1.560,00 ± 160,00 U/L para o isolado 19 do gênero *Mucor*, obtido da Casca do coco Indaiá (*Attalea geraensis*) no quinto dia de fermentação.

Paralelamente ao experimento, foi construída uma curva analítica de glicose, correspondente à relação gráfica entre os valores de absorbância e de concentração. Assim, foi possível verificar a linearidade da reação baseado na análise gráfica, e obter um fator de conversão de valores de absorbância em concentração. O gráfico da curva padrão de glicose foi apresentado na Figura 10.
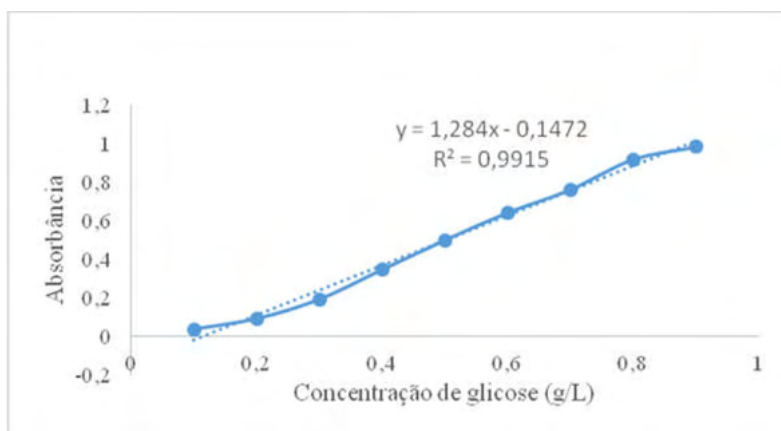
Figura 10: Curva analítica de glicose.

4.2 Avaliação da atividade da enziama β-glicosidase

A atividade da enzima β-glicosidase foi avaliada através do substrato *p*- nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (pNPβG), baseado na metodologia de Tan Mayers e Sanddler (1987). Segundo a qual, quantifica o *p*-nitrofenol liberado pela hidrólise enzimática.

Por este método, obteve-se os gráficos dos perfis da atividade enzimática da β-glicosidase para os fungos dos gêneros *Fusarium* e *Mucor* respectivamente, segundo as Figuras 11 e 12.
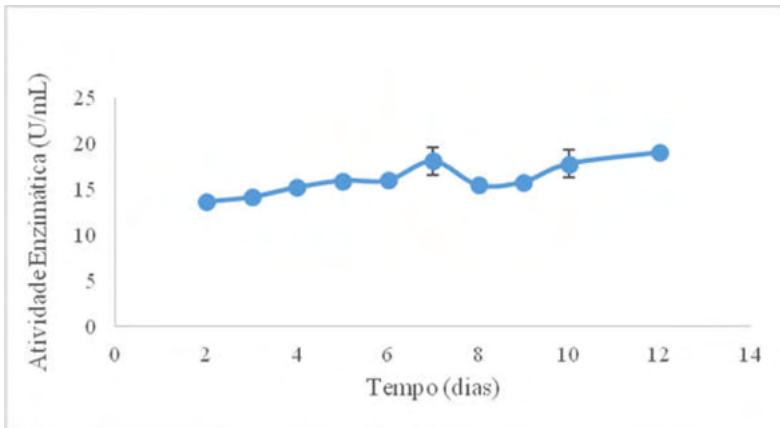
Figura 11: Produção de β-glicosidase por *Fusarium* sp. em função do tempo de cultivo.
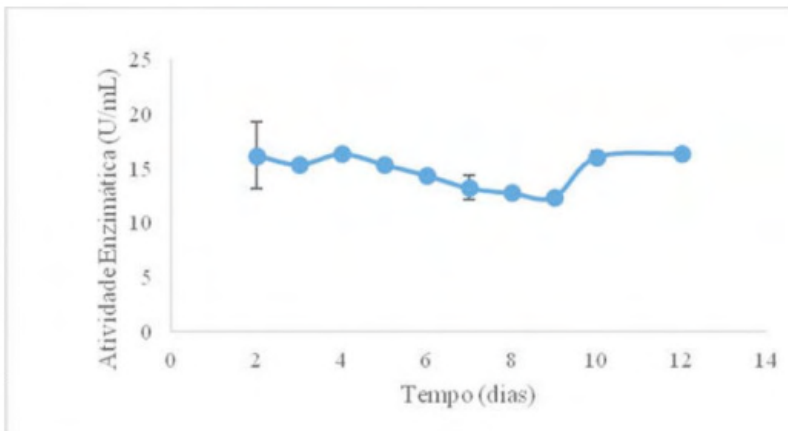
Figura 12: Produção de β-glicosidase por *Mucor circinelloides strain* em função do tempo de cultivo.

Pela Figura 11, foi possível observar que a atividade enzimática da β-glicosidase do fungo *Fusarium* sp. apresentou um perfil constante, obtendo um índice enzimático máximo de 18,982 ± 0,087 U/mL no décimo segundo dia de fermentação.

Já o fungo *Mucor circinelloides strain* apresentou uma boa atividade β-glicosídica até o quarto dia de fermentação, logo após houve uma diminuição na atividade enzimática, obtendo um ponto de mínimo no nono dia. Em seguida, a atividade enzimática voltou a subir até alcançar o ponto de máxima atividade de 16,338 ± 0,104 U/mL no décimo segundo dia, como pode ser verificado na Figura 12.

Em 2015, Gerhardt observou que as linhagens Aspergillus I produziram 8,46 U/mL, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, um valor muito inferior ao

produzido pelos dois fungos avaliados no presente trabalho. Isso demonstra que os mesmos possuem um grande potencial para a produção desta enzima.

Para o teste da β-glicosidase, foi feita uma curva analítica correspondente à relação gráfica entre os valores de absorbância e os de concentração de p-nitrophenol. Assim, foi verificada a linearidade da reação baseado na análise gráfica, e obteve-se um fator de conversão de valores de absorbância em concentração. O gráfico da curva padrão de p-nitrophenol foi apresentado na Figura 13.
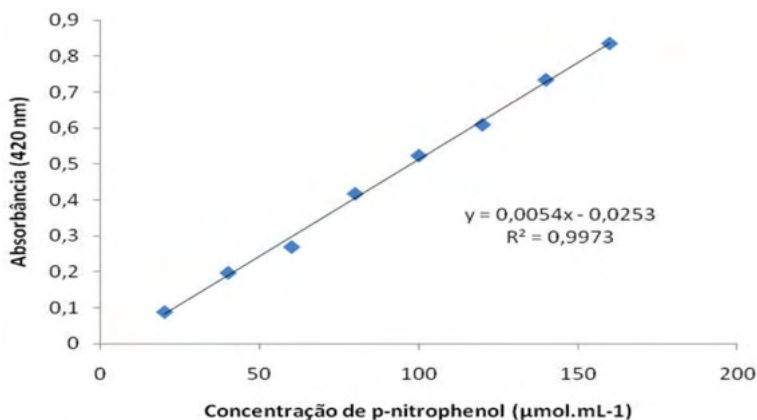
Figura 13: Curva analítica de p-nitrophenol. Fonte: (Faria, 2014).

5 I CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Enzimas com forma de atuação iguais sob o mesmo substrato, tem a possibilidade de apresentar funcionamento ótimo em temperatura, pH e concentração iônica diferentes, o que demanda uma escolha de enzimas adequadas às condições nas quais serão empregadas (PASTORE, 2002). Assim, para se produzir uma enzima comercialmente é necessário selecionar microrganismos produtores e otimizar as condições de atuação desta enzima, para alcançar a rentabilidade e eficiência do processo (SCHMIDELL et al., 2001).

5.1 Efeito da temperatura na atividade da enzima endoglucanase

Na Figura 14 são apresentadas as curvas da caracterização da enzima endoglucanase, frente aos diferentes valores de temperatura, referente aos fungos dos gêneros *Fusarium* e *Mucor*.
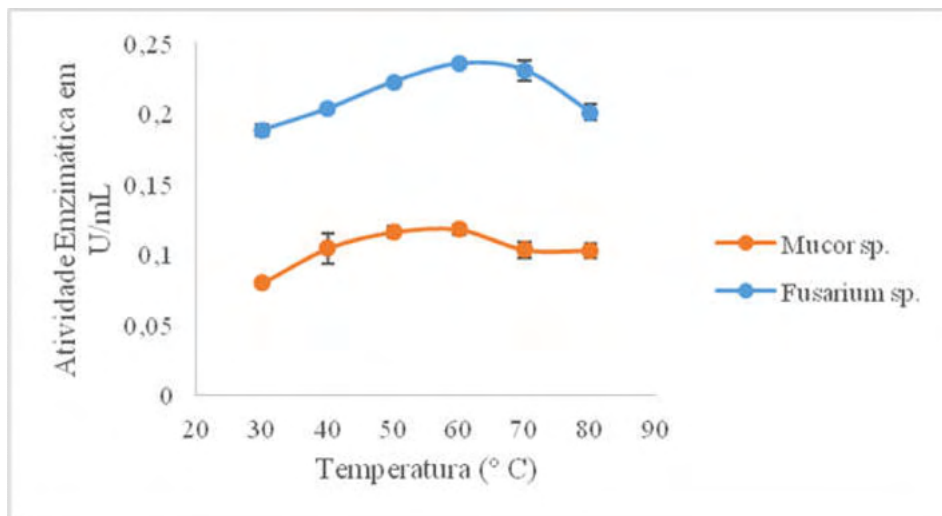
Figura 14: Efeito da temperatura na atividade da enzima endoglucanase presente no extrato enzimático bruto dos dois fungos em estudo.

Pela Figura 14, foi possível observar as atividades endoglicolíticas do extrato bruto dos dois fungos. Sendo que, o fungo *Fusarium* sp. apresentou uma atividade máxima de 0,2351 ± 0,0013 U/mL na temperatura ótima de 60°C. E o *Mucor circinelloides strain* apresentou uma atividade máxima de 0,1174 ± 0,0032 U/mL, também na temperatura ótima de 60°C.

5.2 Efeito do pH na atividade da enzima endoglucanase

Na Figura abaixo, são apresentadas as curvas da caracterização da enzima endoglucanase, frente aos diferentes valores de pH, referente aos dois fungos em avaliação.
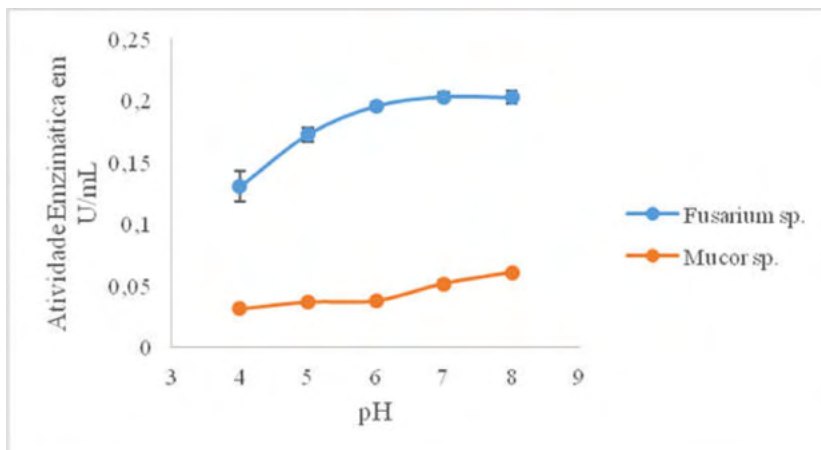
Figura 15: Efeito do pH na atividade da enzima endoglucanase presente no extrato enzimático bruto dos dois fungos em estudo.

Na Figura 15, foi possível observar as atividades endoglicolíticas presentes no extrato bruto dos dois fungos. Sendo que o fungo *Fusarium* sp. apresentou atividade máxima de 0,202 ± 0,003 U/mL, em pH 7,0, apresentando um ligeiro decaimento no pH 8,0. E o fungo *Mucor circinelloides strain* apresentou uma atividade máxima de 0,0603 ± 0,0016 U/mL em pH 8,0.

É importante observar que estas enzimas apresentaram um pH ótimo na faixa de 7 que é um pH neutro e 8 que é um pH levemente alcalino. Isso é interessante para a aplicação dessas enzimas na indústria de detergentes.

5.3 Efeito da temperatura na atividade da enzima β-glicosidase

Na Figura 16 são apresentadas as curvas da caracterização da enzima β-glicosidase, frente aos diferentes valores de temperatura, referente aos dois fungos em estudo.
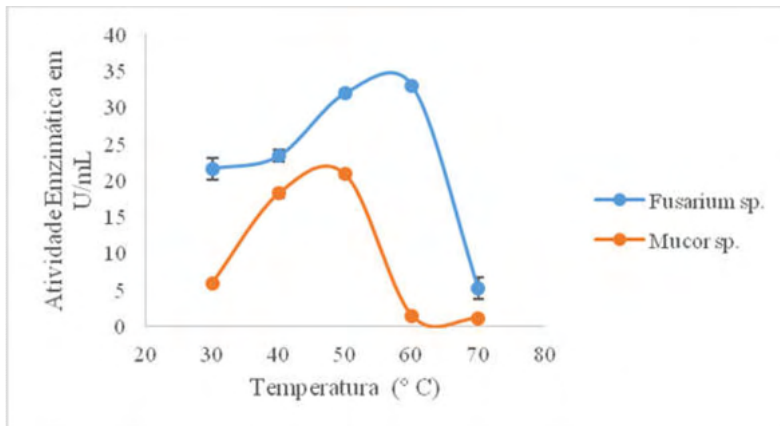
Figura 16: Efeito da temperatura na atividade da enzima β-glicosidase presente no extrato enzimático bruto dos dois fungos em estudo.

Por meio da Figura acima, foi possível avaliar a atividade da enzima β- glicosidase presente no extrato bruto dos dois fungos. Na presente avaliação o fungo *Fusarium* sp. apresentou uma atividade máxima de 32,955 ± 0,078 U/mL, na temperatura ideal de 60°C. E o fungo *Mucor circinelloides strain* apresentou uma atividade máxima de 20,772 ± 0,488 U/mL na temperatura ideal de 50°C.

Observa-se que houve um aumento na atividade β-glicosídica destes fungos, se comparado com o teste "Avaliação da atividade da enziama β-glicosidase". Este aumento ocorreu pelo fato de a temperatura de 30°C utilizada não ser a temperatura ótima das enzimas avaliadas.

5.4 Efeito do pH na atividade da enzima β-glicosidase

Na Figura abaixo são apresentadas as curvas da caracterização da enzima β-glicosidase, frente aos diferentes valores de pH, referente aos dois fungos em estudo.
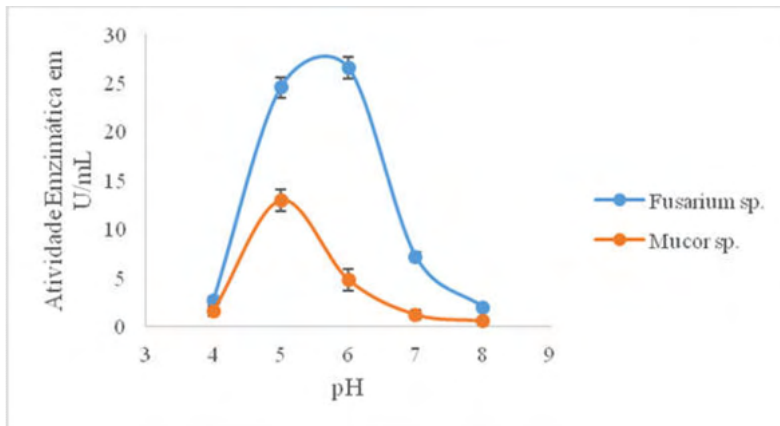
Figura 17: Efeito do pH na atividade da enzima β-glicosidase presente no extrato enzimático bruto dos dois fungos em estudo.

Na Figura 17, foi observada a atividade da enzima β-glicosidase presente no extrato bruto dos dois fungos. Nesta avaliação o fungo *Fusarium* sp. apresentou atividade máxima de 26,511 ± 1,126 U/mL, em pH ótimo 6,0. Já o fungo *Mucor circinelloides strain*, apresentou uma atividade máxima de 12,950 ± 0,916 U/mL em pH ótimo 5,0.

Esses resultados demonstram que as enzimas β-glicosidases destes fungos possuem pHs ótimos ácidos, podendo ser aplicadas em processos industriais ácidos.

6 I APLICAÇÃO DAS ENZIMAS NA CASCA DE CAFÉ

O objetivo deste teste foi avaliar o desempenho do extrato enzimático bruto na hidrólise da casca de café pré-tratada. Para isso foi utilizado: 2 % de casca de café pré-tratada; 50 mL de extrato enzimático bruto do fungo *Fusarium* sp., o qual apresentava atividade endoglicolítica média de 0,2077 ± 0,0018 U/mL e β-glicosídica de 10,6827 ± 0,3841 U/mL; e 50 mL de extrato enzimático bruto do fungo *Mucor circinelloides strain*, o qual apresentava atividade endoglicolítica média de 0,0715 ± 0,0041 U/mL e β-glicosídica de 15,5333 ± 0,8773 U/mL.

Assim, a média da atividade enzimática no extrato enzimático acrescido à casca de café pré-tratada foi de: 0,1396 U/mL da enzima endoglucanase e 13,1080 U/mL da enzima β-glicosidase.

Por meio da Figura 18, foi possível analisar a hidrólise enzimática do extrato bruto na casca de café, em função do tempo de incubação.
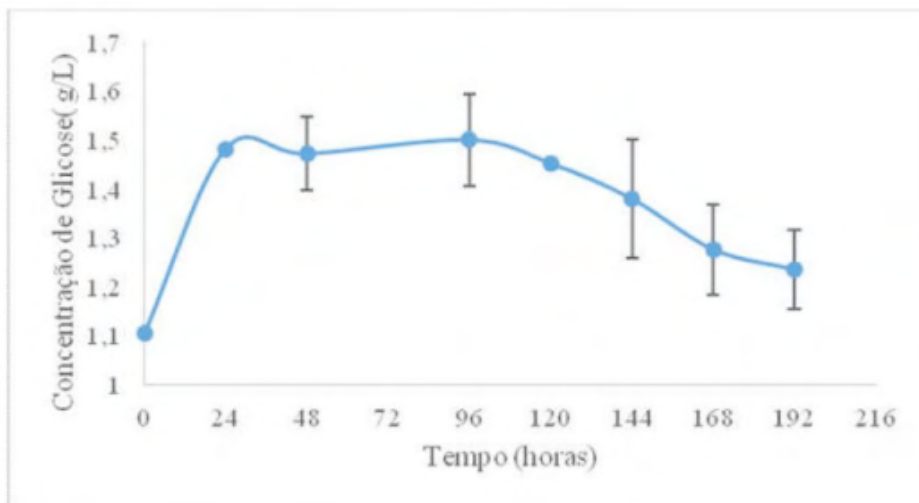
Figura 18: Aplicação dos extratos enzimáticos brutos na casca de café pré-tratada.

Pela Figura 18, pode-se observar a hidrólise da casca em açúcares redutores. Pela mesma Figura, a hidrólise se iniciou a uma concentração de açúcares presentes no extrato enzimático bruto de 1,1047 ± 0,0088 g/L. Em seguida, nota-se que a hidrólise ocorreu rapidamente nas primeiras 24 horas, depois apresentou um certo equilíbrio entre as 24 e 96 horas, quando atingiu seu ponto de máxima concentração de açúcares redutores de 1,4992 ± 0,0941 g/L. Por fim, a concentração de açúcares redutores caiu sistematicamente.

O decaimento sistemático da concentração de açúcares redutores, observado na figura 18, pode ter sido causado pelo crescimento de algum esporo de fungo, que por alguma falha no processo de filtração e centrifugação, possa ter ficado no extrato enzimático bruto dos fungos. Esse fato pode ter influenciado os resultados negativamente, uma vez que, se algum esporo de fungo cresceu no meio, ele estava consumindo os açúcares do mesmo meio. Deste modo, os valores gerados no presente teste podem estar subestimados.

Assim, pelos dados apresentados na mesma Figura, nota-se que a concentração máxima de açúcares hidrolisada foi de 0,3945 g/L em 96 horas, se considerar que o meio já possuia açúcares redutores no início do ensaio de 1,1047 g/L. Assim, subtraindo a concentração máxima de açúcares de 1,4992 g/L, menos a concentração inicial de 1,1047 g/L, têm-se a concentração máxima de açúcares hidrolisada que foi de 0,3945 g/L.

Não foi encontrado na literatura dados da hidrólise de extrato enzimático bruto de *Fusarium* sp. ou *Mucor circinelloides strain* em materiais lignocelulósicos. Pinto

(2010) em seu trabalho, observou que o fungo *Trichoderma resei* liberou 1,24 mg/mL de açúcares, equivalente a 1,24 g/L, após 6 horas de hidrólise, utilizando 6 mL de extrato enzimático em 10 mL de solução e 2% de casca pré-tratada a explosãoa vapor. No mesmo trabalho e utilizando as mesmas condições, o autor conseguiu um valor de 0,97 mg/mL para *Thermoascus aurantiacus*.

Diante dos fatos apresentados e como as condições de ensaios não são as mesmas, não se pode fazer uma havaliação compartiva dos resultados. Sendo assim, estes fungos possuem um potencial celulolítico promissor, para a utilização de suas enzimas, destacando a produção da enzima β-glicosidase pelos mesmos.

CONCLUSÕES

Por meio do presente trabalho, foi possível avaliar o potencial de produção das enzimas celulolíticas (endoglucanase e β-glicosidase) dos fungos *Fusarium* sp. e *Mucor circinelloides strain.* Assim, observou-se que o fungo *Fusarium* sp. apresentou uma produção endoglicolítica de 0,2017 ± 0,0008 U/mL, enquanto que o fungo do gênero *Mucor* alcançou uma produção de 0,3016 ± 0,0018 U/mL no décimo segundo dia de fermentação.

Na produção de enzima β-glicosidase, o fungo do gênero *Fusarium* sp. apresentou uma produção de 18,982 ± 0,087 U/mL, enquanto que o fungo do gênero *Mucor* apresentou uma produção de 16,338 ± 0,104 U/mL, no décimo segundo dia de fermentação.

Na caracterização das enzimas, o fungo do gênero *Fusarium* apresentou atividade endoglicolítica ótima na temperatura de 60°C e pH de 7,0. Já o fungo do gênero *Mucor* apresentou essa atividade ótima na temperatura de 60°C e pH de 8,0. Na caracterização da β-glicosidase, o fungo do gênero *Fusarium* apresentou atividade enzimática ótima na temperatura de 60°C e pH de 6,0. E o fungo do gênero *Mucor* na temperatura ideal de 50°C e pH de 5,0.

Por fim, os extratos enzimáticos brutos dos dois fungos foram utilizados em conjunto para hidrolisar a casca de café pré-tratada. Nesta hidrólise, nota-se que ela ocorreu rapidamente nas primeiras 24 horas. Logo em seguida, apresentou um certo equilíbrio até atingir o ponto de máximo em 96 horas, atingindo um valor de hidrolise de 0,3945 g/L de açúcares redutores.

Portanto, conclui-se que os fungos avaliados possuem um potencial promissor para a produção dessas duas enzimas em estudo, destacando a produção da enzima β- glicosidase produzida pelos dois fungos.

REFERÊNCIAS

ADSUL, M.G., GHULE J. E., SHAIKH H., SINGH R., BASTAWDE K. B., GOKHALE D. V., VARMA A. J. Enzymactic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carbohydradte Polymers** 62:6-10, 2005.

ALBERTON, R. R., VANDENBERGHE, L.P.S, ASSMAN, R., FENDRICH, R.C., LEON, R.J., SOCOOL, C.R. Xylanase production by Streptomyces viridospotus T 7 A in submerged and solid-state fermentation using agroindustria resíduos. **Brazilian Archives of Biology na thecnology.** Vol 52, 171-180, ISSN 1516-8913, 2009.

ARAUJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource. Technol.,** v. 101, p. 4820–4825, 2010.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, p. 719-739, 2005.

AWAFO, V. A.; *Tese de Doutorado,* McGill University, Canadá, 1997.

BAEK, S.; KIM, S.; LEE, K.; LEE, J.; HAHN, J. Cellulosic ethanol production by combination of cellulase-displaying yeast cells. **Enzyme Microb.Tech**., v. 51, p. 366- 372, 2012.

BAFFI, M. A.; ROMO-SÁNCHEZ, S.; ÚBEDA-IRANZO, J.; BRIONES-PÉREZ, A. I. Fungi isolated from olive ecosystems and screening of their potential biotechnological use. New Biotechnology, v. 29, n. 3, 2012.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Manage**. v. 32, p. 1341-1346, 2012.

BARTHOLO, G. F. et al. Cuidados na colheita, no preparo e no armazenamento do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 14, n. 162, p. 33-44, 1989.

BARCELOS, A. F.; PAIVA, P. C. A.; PÉREZ, J. R. O.; SANTOS, V. B.; E CADORSO, R. M. Composição Química da casca e polpa desidratada de café (*Coffea arabica L.)* armazenadas em diferentes períodos. In: II Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil. Espírito Santo, 2001.

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v.45, n.11, p.1282-1289, nov. 2010.

BAYER, E.A. & LAMED, R. The cellulase pardox: polutante por ecellence and/or a reclaineble natural resourc? **Reviw Biodegradtion**, 3 (2-3), 171-88, 1992.

BHAT, M. K.; BHAT, S.; Biotechnol. Adv. 1997, 15, 583.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv**., v. 18, p. 355–383, 2000.

BINOD, P.; JANU, K. U.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production .*In*: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S. C.; DUSSAP, C. G.; GNANSOUNOU, E. (Ed.). **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**.Oxford: Academic Press, 2011, ch. 10, p. 229-250.

BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R. R.; VIKRAM, S.; DEVI, L., NAGALAKSHMI, S.; KURIRN, N.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technol**., v. 101, p. 4767–4774, 2010.

BONILLA HERMOSA, V. A. Aproveitamento dos resíduos do processamento semi- seco do café para a produção de compostos de valor agregado. Dissertação (Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2014.

BORTOLAZZO, N. G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar. 77 f. Dissertação (Microbiologia Agrícola) Universidade de São Paulo-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2011.

BOTHA, A.; KOCK, J. L. F.; COETZEE, D. J.; BOTES, P. J. Physiological properties and fatty acid composition in *Mucor circinelloides f. Circinelloides*. **Antonie van Leeuwenhoek,** v. 71, p. 201-206, 1997.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BACKHOUSE, D. et al. Biodiversity and populatin studies on *Fusarium*. In: LOGRIECO, A.; SEIFERT, K. A.; LESLIE, J. F. A. et al. Biodiversity of toxigenic Fusarium species. Sydowia, Horn, v.30, p. 1-11. 1997.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Steam-exploded sugar cane bagasse for on-site production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Energ. Fuel**., v. 26, p. 5316–5320, 2012.

CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Res**. 37: 233–38, 2009.

CAO, Y.; TAN, H. Effect s of cellulase on the modification of cellulose.Carbohydrate Research,v. 337, p. 1291-1296, 2002.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JÚNIOR, NEI. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quim. Nova***,* v. 33, p. 181-188, 2010.

CAZy: Carbohydrate-Active enZYmes Database. (2014). Disponível em: <http://www.cazy.org/>. Acesso: 30 de jun. de 2017.

CHU, F.; LIN, C.; I, Y.; WU, C.; C, D. Hydrolysis of bamboo cellulose and cellulase characteristics by Streptomyces griseoaurantiacus ZQBC691.J. **Taiwan Inst. Chem. Eng.**, v. 43, p. 220–225, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO Disponível em**: <**http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_18_15_37_37_boletim_ cafe_-_maio_2017.pdf >. Acesso: 12 de nov. de 2017.

COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. β-1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnol. Appl.** Biochem. 17: 259-289, 1993.

CUNHA, F. M.; ESPERANÇA, M. N.; ZANGIROLAMI, T. C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulose. **Bioresource Technol**., v. 112, p. 270-274, 2012.

DASHTBAN, M., SCHRAFT, H., QUIN, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Oportunits e Perspectivies. **International Journal of Biological Sciences.** 5:578-595, 2009.

DENG, W.; LOBO, R.; SETTHAPUN, W.; CHRISTENSEN, S. T.; ELAM, J. W.; MARSHALL, C. L. Oxidative Hydrolysis of Cellobiose to Glucose. **Catal Lett.** v. 141, p. 498–506, 2011.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulose production by a brown rot fungus Fomitopsis sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technol.,** v. 102, p. 6065-6072, 2011.

DOUGTHERTY, M.J., D'HASELEER, P., HAZEN, C.J., SIMNONS B.A., ADAMS, P.D., HADI, M. Glucoside hydrolases from targed compost metagenome, activity- screening and functional characterization. **BMC Biotechnolgy;** 12: 38, 1472-6750, 2012.

DURSO, T. F. A. Otimização da hidrólise enzimática da casca de café visando à produção de açúcares fermentescíveis. **Relatório apresentado ao Programa de Iniciação Científica-PIBIC/CNPq/UFSJ**, 2016.

ELISASHVILI, V.L. Biosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher Basidiomycetes. **Applied Biotechnology and Microbiology**, New York, v. 29, p. 257- 266, 1993.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. Fungos: uma introdução à biologia e biotecnologia. 2 ed. Caxias do Sul: Educs, 2010.

FARIA, T. N. Caracterização de enzimas com atividade celulítica produzidas por fungos isolados a partir da casca de café. TCC (Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos) - Universidade Federal de São João Del-Rei, 2014.

FELLOWS, P. Tecnologia del Procesado de Los Alimentos: Principios e Práticas. **Zaragoza**: Editorial Acribia, p.172-177, 1994.

FERREIRA, E.X.F., Xilanase. In: SAID, S. &PIETROR, C.R.I. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, cap 8, p. 137-148, 2004.

GARCIA, A. W. R.; MATIELLO, J. B.; JAPIASSU L. B. Avaliação do efeito nutricional de vários tipos de palha de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 30, 2004, São Lourenço. Trabalhos apresentados... Varginha: PROCAFÉ, 2004. p. 63-64.

GEORGE, S. P.; AHMAD, A.; RAO, M. B. Studies on carboxymethyl cellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete. **Bioresource.Technol**., v. 77, p. 171- 175, 2001.

GERHARDT, J. A.; CARVALHO, I. F. SILVA, M. L.; POLIZELI, M. L.T. M.; ALNOCH, R. C. Avaliação Da Atividade Celulolítica De Fungos Filamentosos Isolados De Amostras De Solo Da Região Norte Do Estado De Mato Grosso. 2015.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. Pure & Appl. Chem. v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GLASS, N. L.; SCHMOLL, M.; CATE, J. H. D.; CORADETTI, S. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Annu. Rev. Microbiol.** 67: 477-498, 2013.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E, P. S. Cellulases, xylanases, β-glucosidase and ferulic acid esterase produced by Trichoderma and Aspergillus act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochem. Eng**, J., v. 51, p. 72– 78, 2010.

HIDENO, A.; INOUE, H.; TSUKAHARA, K.; YANO, S.; FANG, X.; ENDO, T.; SAWAYAMA, S. Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source. **Enzyme Microb.Tech**. v. 48, p. 162–168, 2011.

HUI, J.P M.; WHITE, T.C.; THIBAULT, P. Identification of glycan structure and glycosylation sites in celobiohydrolase II and endoglucanase I and II from Trichoderma reesei. **Glycobiology,** v.12, p. 837-849, 2002.

KASANA, R.C.; SALWAN, R.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. Curr. Microbiol. V.57, p.503-507, 2008.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C. e WINN, J.W.C. Diagnóstico Microbiológico: **Texto e Atlas Colorido.** 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465p.

KUBICEK, C. P. Release of carboxymethyl-cellulase and _-glucosidase from cell walls of Trichoderma reesei. **European journal of applied microbiology and biotechnology,** v. 13, n. 4, p. 226-231, 1981/12/01 1981. ISSN0171-1741. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/BF00500103 >. Acesso: 30 de jun. de 2017.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. L. Microrganisms and enzymes envolved in the degradation of plant fiber cell walls. In: ERIKSSON, K. E. L. (Ed.), Biochemical **Engineering Biotechnology**. Berlin: Springer-Verlag, v. 57, p.45–126, 1997.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef *(eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology,** v. 77, n.1, p. 348-352, 1994.

LEVASSEUR, A., E. DRULA, V. LOMBARD, P. M. COUTINHO, AND B. HENRISSAT. "Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes." ***Biotechnol Biofuels*** no. 6 (1):41. doi: 10.1186/1754-6834-6-41, 2013**.**

LIM, J. S.; MANAM, Z. A.; ALWI, S. R. W.; HASIM, H.A review on utilisation of biomass from rice industry as a source of renewable energy. **Renew. Sust. Energ. Rev**., **v.** 16, p. 3084-3094, 2012.

LIN, Y. & TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resourcers: current states and prospects. App. **Microbiol. Biotechnol.** 69: 627-642, 2006.

LIU, L.; SUN, J.; CAI, C.; WANG, S.; PEI, H.; ZHANG, J. Corn stover pretreatment by inorganic salts and its effects on hemicelluloses and cellulose degradation. **Bioresource.Technol**., v. 100, p. 5865–5871, 2009.

LIU, J.; WANG, M. L.; TONNIS, B.; HABTESELASSIE, M.; LIAO, X.; HUANG, Q. Fungal pretreatment of switchgrass for improved saccharification and simultaneous enzyme production. **Bioresource.Technol**, 2012.

LOPEZ, J.A.; LAZARO, C.C.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G; CASTRO, A. M. Characterization of muitienzyme solutions produced by solid-state fermentation of babaçu cake, for use in cold hydrolysis of raw biomass. **Biochemical Engineering,** v.77, p. 231-239, 2013.

LUBBEHUSEN, T. L.; NIELSEN, J.; MCINTYRE, M. Morphology and physiology of the dimorphic fungus *Mucor circinelloides* (syn. M. racemosus) during anaerobic growth. **Mycological Reserach**, v.107, n. 2, p. 223-230, 2003.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H van; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v. 66, n. 3, p. 506-577. 2002.

MAEDA, R. N.; BARCELOS, C. A.; SANTA ANA, L. M. M .; PEREIRA JÚNIOR, N.Cellulase production by Penicillium funiculosum and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **J. Biotech**. 2012.

MARTINS, L.F. Caracterização do complexo celulásico do Penicillium echinulatum. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Laboratório de Química de Fitobiomassas, Curitiba-Paraná, 2005.

MATIELLO, J. B. O café do cultivo ao consumo. São Paulo: **Globo**, 1991. p. 320.

MEDVE, J. Cellulose Hydrolysis by Trichoderma reesei cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of celobiohydrolase I, II and endoglucanases II. **Tese (Doutorado)**. Lund University, Departament of Biochemistry, Lund, Sweden, 1997.

MILANESI, P. M. Caracterização, toxidade e patogenicidade de *Fusarim* spp. Em genótipos de soja em sistemas de plantio direto. 2009. 91 P. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria 2009.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica- agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>. Acesso: 11 de nov. de 2017.

MITRA, D.; RASMUSSEN, M. L.; CHAND, P.; CHINTAREDDY, V. R.; YAO, L.; GREWELL, D.; VERKADE, J. G.; WANG, T.; LEEUWEN, J. H. V. Value-added oil and animal feed production from corn-ethanol stillage using the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. **Bioresource Technology**, v.107, p. 368-375, 2012.

MONTE, J. R.; BRIENZO, M.; MILAGRES, A. M. F. Utilization of pineapple stem juice to enhance enzyme-hydrolytic efficiency for sugarcane bagasse after an optimized pre-treatment with alkaline peroxide. **Appl. Energ**., v. 88, p. 403-408, 2011.

MORAIS, M. S. A.; GEORGES, F.; ALMEIDA, S. R.; DAMASCENO, F. C.; MACIEL, G. P. S.; ZINI, C. A.; JACQUES, R. A.; CARAMÃO, E. B. Analysis of products from pyrolysis of Brazilian sugar cane straw. **Fuel Process. Technol**., p. 101, v. 35–43, 2012.

MORAIS, M. S.; OLIVEIRA, N. T.; HERCULANO, P. N.; MOREIRA, K. A. Complexo celulolítico produzido por duas espécies de fungos fitopatogênicos isolados de mandioca. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/sp/v42n3/0100-5405-sp- 42-3-0249.pdf>. Acesso: 18 de jul. de 2017.

MUÑOZ, I. G. et al. Family 7 cellobiohydrolases from Phanerochaete chrysosporim: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CHB 58) at 1.32 Å resolution and homology models of the lisozymes. **Journal of Molecular Biology**, v. 314, p. 1097– 1111, 2001.

MURTHY, P.S., MADHAVA NAIDU, M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition – **A review. Resources, conservation and recycling** 66, 45-58, 2012.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência H**., v. 41, p. 28-33, 2007.

MUSSATTO, S. I.; MACHADO, E. M.; MARTINS, S; TEIXEIRA, J.A. Production, composition, and aplication of coffe and its industrial residues. **Food and Bioprocess Technology** 4 (5), 661-672, 2011.

MICOLOGY ONLINE. The University of Adelaide, School of Molecular & Biomedical Science. Copyright © 2014. Disponível em: < http://mycology.adelaide.edu.au/ >. Acesso: 01 de nov. de 2017.

NATIVIDADE, F. P. Isolamento de fungos com atividades enzimáticas de interesse biotecnológico a partir da casca de café. Trabalho de Conclusão de Curso Universidade Federal de São João del-Rei, 2014.

OLIVEIRA, J.C. **Atlas de Micologia Média: Lâminas.** 2013. Disponível em: < http://www.controllab.com.br/pdf/atlas_micologia_laminas.pdf >. Acesso: 01 de nov. de 2017.

PALOMER, X.; DOMÍNGUEZ, E.P.; VENDRELL, M.; LLOPI.T.. Study of the strawberry Cel1 endo-β-(1,4)-glucanase protein accumulation and characterization of its in vitro activity by heterologous expression in *Pichia pastoris*. **Plant Science.** v. 167, p. 509-518. 2004.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R. ROUSSOS, S. Biotechnological Potential of Coffee Cup and Coffee Husk for Bioprocesses. **Biochem. Eng. J.,** 6:153-162, 2000.

PAPAGIANNI, M., 2004 Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 22, p. 189-259.

PARK, E.Y.; NARUSE, K.; KATO, T. Improvement of cellulase production in cultures of Acremonium cellulolyticus using pretreated waste milk pack with cellulase targeting for biorefinery. **Bioresource Technol**., v. 102, p. 6120–6127, 2011.

PASTORE, G. M. Processos e produção de alimentos: aplicação de enzimas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. **Anais**...Brasília: UnB, 2002. CD-ROM.

PEREIRA, E. C. Identificação de fungos filamentosos isolados da casca de café e da madeira através de técnicas de biologia molecular. **Relatório apresentado ao Programa de Iniciação Científica-PIBIC/CNPq/UFSJ, 2017**

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTINEZ, J. Biodegradation and biological treatment of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. Int. **Microbiol**. 5: 53-63, 2002.

PINTO, T. O. P. Produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *Thermoascus aurantiacus* CMBAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 e aplicação na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar com diferentes pré-tratamentos. **Dissertação (mestrado)**. Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2010.

RABELO, S. C. Avaliação E Otimização De Pré-Tratamentos E Hidrólise Enzimática Do Bagaço De Cana-De-Açúcar Para a Produção De Etanol De Segunda Geração, 447, 2010.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v.1, n.3, 1998.

SALIBA, E.O.S., RODRIGUES, N.M., MORAIS, S.A.L. Lignins-Isolation Methodos and chemical characterizatio. **Ciência rural,** 31, n5, 917-928, 2001.

SALOHEIMO, M; NAKARI-SETÄLÄ, T; TENKANEN, M; PENTTILÄ, M., cDNA cloning of a Trichoderma reesei cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast, **European Journal of Biochemistry,** v.249, p.584-591, 1997.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol Adv. Mar** – Apr; (2): 185-194, 2009.

SANT'ANNA JÚNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. (Coords.). **Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos.** São Paulo: Edgard Blücher Ltda., p. 351- 362, 2001.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova,** v. 35, p. 1004-1010, 2012a.

SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chem**., v. 133, p. 1299–1304, 2012b.

SANTOS, A. F. C. S. Hidrólise ácida diluída da fração hemicelulósica da casca de café visando a obtenção de açúcares fermentescíveis. **Relatório apresentado ao Programa de Iniciação Científica-PIBIC/CNPq/UFSJ**, 2015c.

SCHAFER, T.; KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C.; PEDERSEN, S.; SALMON, S.; OLSEN, H. S.; DEINHAMMER, R.; LUND, H. Enzymes for Technical Applications. **Biopolymers Online**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2005. Disponível em: <http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v07/vol07_04.pdf>. Acesso: 14 de nov. de 2017.

SCHIMIDELL, W et al. **Biotecnologia industrial.** São Paulo: E Blücher, 2001. v.2. 54 p.

SCHWARZE, F.W.M.R. Wood decay under the microscope. **Fungal Biology Reviews,** vol. 21, ed. 4, p. 133-170, 2007.

SECRETARIA ESPECIAL DE AGRICULTURA FAMILIAR E DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO. Disponível em: <http://www.mda.gov.br/sitemda/noticias/minas-gerais-sai-na-frente-com-safra- recorde--de-caf%C3%A9 >. Acesso: 11 de nov. de 2017.

SINGH, A.; SHARMA, P.; SARAN, A. K.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized Saccharomyces cerevisiae on various matrices. **Renew. Energ**., v. 50, p. 488-493, 2013.

SINGH, A.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. Enzymatic hydrolysis of chemical pretreated rice straw by *Aspergillus niger* and *Aspergillus heteromorphous*. **J. Sci. Ind. Res**., v. 69, p. 232-237, 2010.

SINGH, R.; VARMA, A. J.; LAXMAN R. S.; RAO, M. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: Comparison with commercial cellulose. **Bioresource Technology**. n.100, p.6679–6681, 2009.

SINGHANIA, R. R. Production of celluloytic enzymes for the hydrolysis of lignocellulosic biomass. *In*: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S. C.; DUSSAP, C.; GNANSOUNOU, E. (Ed.). Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes. **Oxford: Academic Press**, ch. 8, p. 177-201, 2011.

SINGHVI, M. S.; ADSUL, M. G.; GOKHALE, D. V. Comparative production of cellulases by mutants of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 and its application. **Bioresource. Technol**., v. 102, p. 6569–6572, 2011.

SINSABAUGH, R. L.; LIPTAK, M. A. Enzymatic Conversion of Plant Biomass. In: ESSER, K.; LEMKE, P. A. The Mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimentals systems for basic and applied research. Berlin: **Spring-Verlag**, p. 347– 357, (Enviromental and Microbial Relationships, IV), 1997.

SOCCOL, C. R.; FARACO, V.; VANDENBERGHE, L. P. S.; THOMAZ-SOCCOL, V.; WOICIECHOWSKI, A.; PANDEY, A. Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Future Perspectives. *In*: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S. C.; DUSSAP, C. G.; GNANSOUNOU, E. (Ed.). Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes. Oxford: **Academic Press**, ch. 5, p. 101-122, 2011.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRERA, M. A.; BOM, E. P. S.; MORAIS, L. M. P.; ARAUJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource. Technol.,** v. 101, p. 4820–4825, 2010.

SOUZA, A. L.; GARCIA, R.; PEREIRA, O. G.; CECON, P. R.; FILHO, S. C. V.; PAULINO, M. F. Composição químico-bromatológica da casca de café tratada com amônia anidra e sulfeto de sódio. **Rev. Bras. Zootec.,** 30 (3): 983-991, 2001.

SOUZA, I. F. Isolamento e avaliação de fungos filamentosos naturalmente ocorrente em biomassas lignocelulósicas para a produção de enzimas holocelulolíticas. **Dissertação** (Pós-Graduação em Biocombustíveis). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2015.

SRINIVASAN, K. et al. Efficient production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by the rumen anaerobic fungus, Neocallimastix frontalis, in a repeated batch culture. **Journal of Bioscience and Bioengineering, Osaka,** v. 91, p. 153-158, 2001.

STRUSZCZYK, K.; SZCZESNA-ANTCZAK, M.; WALCZAK, M.; POMIANOWSKA E.; ANTCZAK, T. Isolation and purification of *Mucor circinelloides* intracellular chitosanolytic enzymes. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 16-24, 2009.

SU, C. H.; CHUNG, M. H.; HSIEH, H. J., CHANG, Y. K.; DING, J. C.; WU, H. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass in ionic liquid media for fermentable sugar production. J. **Taiwan Inst. Chem. Eng**., v. 43, p. 573–577, 2012.

SZIJÁRTÓ, N. et al. Cellulase fermentation on a novel substrate (waste cardboard) and subsequent utilization of home-produced cellulase and commercial amylase in a rabbit feeding trial. **Industrial Crops and Products**, v. 20, p. 49–57, 2004.

TAKANO, M.; HOSHINO, K. Direct ethanol production from rice straw by coculture with two high-performing fungi. **Frontiers of chemical science and engineering**, doi: 10.1007/s11705-012-1281-6, 2012.

TAKÓ, M.; TÓTH, A.; NAGY, L. G.; KRISCH, J.; VÁGVÖLGYI, C.; PAPP, T. A new β-glucosidase gene from the zygomycete fungus Rhizomucor miehei. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, n. 1, p. 1-10, 2010.

TAN, L. U. L.; MAYERS, P.; SANDDLER, J.N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Can. J. Microbiol.**,v. 33, p.689-692, 1987.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R. e CASE, C.L. **Microbiologia.** 10ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TURNER, P., MAMO, G., KARLSSON, E.N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. **Microbial Cell Factories** 6, 9-32. 2007.

UBHAYASEKERA, W. et al. Structures of Phanerochaete chrysosporium Cel7D in complex with product and inhibitors. **Febs Journal**, v. 272, p. 1952-1964, 2005.

VAN DEN BRINK, J.; de VRIES, R. P. (2011). Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. Appl. **Microbiol. Biotechnol**. 91: 1477-1492.

VARNAI, A., SIIKA, M., VIIKARI, L. Restrition of the enzymatic hydrolysis of steam- preteated spruce by lignin and hemicelulose. **Enzyme and Microbial Technology** 46:185-193, 2010.

WADA, M.; IKE, M.; TOKUYASU, K. Enzymatic hydrolysis of cellulose I is greatly accelerated via its conversion to the cellulose II hydrate form. **Polym. Degrad. Stab**., v. 95, p. 543-548, 2010.

XIA, C.; XHANG, J.; ZHANG, W.; HU, B. A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. **Biotechnology Biofuels**, v. 4, n. 15, 2011.

ZANGH, P., LYND, R.L. Toward and aggregated understanding of enzymatic hydrolis of cellulose: Noncomplex cellulase systems. **Biotechnology and Bioengeneering**. V8, n7, 797-824, 2004.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R.; WANG, D. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated saline crops for fermentable sugar production. **Applied Energy,** v. 86, p. 2459–2465, 2009.

SOBRE OS AUTORES

LEIDILENE CRISTINA DE ANDRADE - Possui graduação em Engenharia de Bioprocessos. Tem desenvolvido trabalhos de pesquisa na área de isolamento e identificação de microrganismos, além de obtenção e caracterização de enzimas de interesse industrial.

RENATA CAROLINA ZANETTI LOFRANO - Professora Associada III do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São João Del Rei - Campus Alto Paraopeba (DEQUI/UFSJ/CAP). Membro do corpo permanente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEQ). Possui Doutorado em Ciências pela Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP (2002). Desenvolve pesquisas em síntese de biopolímeros visando-se aplicações como biomateriais.

BOUTROS SARROUH - Professor Adjunto do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO) da Universidade Federal de São João Del-Rei. Possui Doutorado em "Biotecnologia Industrial" pela Universidade de São Paulo-USP/Brasil (2009). Desenvolve trabalhos de pesquisa com foco na produção de enzimas e bioporodutos a partir de resíduos agroindustriais renováveis por meio de processos químicos e biológicos.